

Aus dem Physiologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen über die Sauerstoffbindung
des membrangebundenen Hämoglobins
im Vergleich zu freiem, gelöstem Hämoglobin.

Ein Modell für die Beeinflussung der funk-
tionellen Eigenschaften eines Proteins durch
die Bindung an eine biologische Membran.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin —

vorgelegt von
Karl Ludwig Hilt
aus Mainz

Mainz 1981 —



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554418_0053

Aus dem Physiologischen Institut
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchungen über die Sauerstoffbindung des membrangebundenen Hämoglobins im Vergleich zu freiem, gelöstem Hämoglobin.

Ein Modell für die Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften eines Proteins durch die Bindung an eine biologische Membran.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von
Karl Ludwig Hilt
aus Mainz

Mainz 1981



Dekan: Professor Dr.med. K.-H. Bäßler

1. Gutachter: Professor Dr.rer.nat., Dr.med. W.K.R. Barnikol
2. Gutachter: Professor Dr.rer.nat., Dr.med. G. Thews

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 1981

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung	1
II. Methodik	6
1. Das Ionenmilieu	6
2. Präparation der Membransuspension	8
3. Präparation der Hämoglobinlösung	10
4. Die pH-Werte	11
5. 2,3-Diphosphoglycerat	12
6. Die Gase	12
7. Die Messung der Sauerstoffbindungskurve	13
a) Die Meßapparatur	13
b) Registrierung und Auswertung der Bindungskurve	15
c) Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Verfahrens	20
III. Ergebnisse und Diskussion	23
1. Die reziproken Beziehungen	23
2. Die Sauerstoffbindungskurve des membran- gebundenen im Vergleich zum gelösten Hämoglobin (Übersicht)	28
3. P_{50} -Analyse: Abhängigkeit des Halbsättigungsdruckes von den Effektoren	33
a) Einfluß des pH-Wertes und des CO_2 - Partialdruckes (PCO_2) (H^+ - und CO_2 - Gradient, sogen. Bohr-Faktor und CO_2 -Faktor)	33
b) Einfluß von 2,3-Diphosphoglycerat	39
c) Zusammenfassung	41
4. Gradientenanalyse	42
5. Die $n(\text{S})$ -Funktion und die $\Delta n(\text{S})$ -Funktion	54
a) Die $n(\text{S})$ -Funktion	54
b) Versuch einer Interpretation der $n(\text{S})$ -Funktion	56
c) Die $\Delta n(\text{S})$ -Funktion	57
d) Meßergebnisse	58

	Seite
IV. Zusammenfassung	67
V. Tabellenanhang	71
VI. Literatur	114

I. Einleitung

Eine der zentralen Aufgaben des Erythrozyten ist der Transport von Sauerstoff von den Lungenalveolen zu den Orten des Verbrauchs, den Körpergeweben. Die rote Blutzelle bewerkstelligt dies durch das Hämoglobin, das sie in großen Mengen (30-35 g Hämoglobin in 100 ml Zellen) in ihrem Inneren enthält. Das Hämoglobin setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, einer Eiweißkomponente und einer prosthetischen Gruppe, dem Häm. Vier Polypeptidketten mit jeweils einem Häm bauen das Hämoglobinmolekül auf. Durch die Bindung an die Eiweißkette erhält das Häm die entscheidende Eigenschaft, Sauerstoff locker und reversibel binden zu können. Das Verhältnis von sauerstoffbeladenen zu insgesamt vorhandenen Bindungsstellen, mit anderen Worten die Sauerstoffsättigung, ist abhängig von der Konzentration des physikalisch gelösten Sauerstoffs. Die Sauerstoffkonzentration einer Lösung ihrerseits ist direkt proportional dem Sauerstoffpartialdruck. Die Auftragung der Sauerstoffsättigung auf der Ordinate in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck ergibt die bekannte Sauerstoffbindungskurve bzw. Sauerstoffdissoziationskurve mit ihrem sigmoiden Verlauf. Diese Kurve ist charakteristisch für den molekularen Mechanismus der O_2 -Hb-Reaktion.

In der Literatur der letzten Jahre (DODGE et al., 1963; WALLACH et al., 1973; FISCHER et al., 1975) findet man immer wieder die Beobachtung berichtet, daß das Hämoglobin des Erythrozyten nicht nur in frei gelöster Form vorliegt, sondern daß auch ein gewisser Anteil an die Erythrozytenmembran gebunden ist. Dieses Phänomen der Bindung eines funktionellen Proteins an eine biologische Membran ist nicht ungewöhnlich, wenn man sich daran erinnert, daß zahlreiche Enzyme membrangebunden sind und nur so ihre Funktion erfüllen.

Welche Bedeutung die Bindung von Hämoglobin an die Erythrozytenmembran für Struktur und Funktion der beiden Bindungspartner hat, ist bis heute ungeklärt. Es ist jedoch zu erwarten, daß sich Hämoglobin und Membran gegenseitig in ihrem funktionellen Verhalten beeinflussen.

Für die Beeinflussung der Funktion der Erythrozytenmembran durch das Hämoglobin finden sich einige experimentelle Hinweise. Man kann die Erythrozytenmembranen durch hypoosmolare Lösungsmittel hämoglobinfrei waschen. Die leeren Membransäcke verschließen sich wieder; aber die so erhaltenen sogenannten "ghosts" scheinen undicht zu sein, das heißt funktionell beschädigt, wenn sich auch nicht beweisen läßt, daß diese Schäden durch den Hämoglobinentzug verursacht sind (WALLACH und WEIDEKAMP, 1973).

Die Agglutination der Erythrozyten von Patienten mit Sichelzellanämie durch Antiseren ist abhängig vom Sauerstoffpartialdruck. Oxygenierte "Sichelzellerythrozyten" werden wie normale Erythrozyten agglutiniert, während desoxygenierte "Sichelzellerythrozyten" mit diesen Antiseren nicht mehr agglutinieren, obwohl auch im desoxygenierten Zustand die Antikörper gebunden werden (BESSIS et al., 1954). Die Permeabilität des "Sichelzellerythrozyten" für Natrium- und Kalium- Ionen ist ebenfalls abhängig von der Sauerstoffsättigung des Sichelzellhämoglobins. Desoxygenierte, hypoxische "Sichelzellerythrozyten" zeigen einen beschleunigten Kalium-einstrom und -ausstrom. Der Kaliumverlust ist größer als der Einstrom, so daß die Zelle insgesamt Kalium verliert. Für das Natrium-Ion gelten vergleichbare Verhältnisse: Natrium-einstrom und -ausstrom werden im desoxygenierten Zustand beschleunigt; der Einstrom überwiegt jedoch, so daß der Natriumgehalt des Erythrozyten zunimmt. Bei der Oxygenierung kehren sich diese Effekte um. Da Sichelzellhämoglobinlösungen die gleiche Affinität für Natrium und Kalium unabhängig von der Sauerstoffsättigung besitzen, muß man an-

nehmen, daß diese Ionenverschiebungen durch Permeabilitätsänderungen der Membranen bedingt sind; die Permeabilitätsänderungen wiederum werden durch Strukturänderungen des Hämoglobins bewirkt (BESSIS et al., 1954; WALLACH und WEIDEKAMM, 1973). Somit wäre Hämoglobin Mediator für den Einfluß von Sauerstoff auf die Funktion der Erythrozytenmembranen.

Wie jedoch das Hämoglobin in seinen Funktionen durch die Membranbindung beeinflusst wird, ist unbekannt und soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

Neuere Untersuchungen über die Natur der Hämoglobin-Membranbindung (SHAKLAI et al., 1977; SHAKLAI et al., 1977) führen zu folgenden Ergebnissen:

Die Bindungsstellen für Hämoglobin befinden sich an der Innenfläche der Erythrozytenmembran.

Man kann zwei Arten von Bindungsstellen unterscheiden: Solche von niedriger Affinität mit einer Bindungskonstanten von $6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ und solche von höherer Affinität mit einer Bindungskonstanten von $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Während sich die Zahl der niedrigaffinen Rezeptoren mit Art und Alter der Präparation ändert, bleibt die Zahl der hochaffinen Rezeptoren konstant. SHAKLAI et al. (1977) vermuten daher, daß die niedrigaffinen Bindungsstellen durch die Präparation entstehen; die hochaffinen Bindungsstellen hingegen könnten auch im intakten Erythrozyten existieren und damit möglicherweise eine Rolle für die Membranstruktur und -funktion in vivo spielen. Die Zahl dieser Bindungsstellen geben die Autoren mit $1,2 \times 10^6$ pro Erythrozyt an. Ionenstärke und pH-Wert des Milieus beeinflussen die Hämoglobin-Membran-Wechselwirkung; man kann daher schließen, daß die bindenden Kräfte elektrostatischer Natur sind (SHAKLAI et al., 1977; FISCHER et al., 1975).

Die Erythrozytenoberfläche beträgt etwa $147 \mu\text{m}^2$ (GUL und SMITH, 1974) der Radius eines Hämoglobinmoleküls etwa 3 nm

(MUIRHEAD et al., 1967). Aus den oben genannten Zahlen läßt sich abschätzen, daß die Bindungsstellen beim intakten Erythrozyten weitgehend abgesättigt sind. Das würde bedeuten, daß etwa 20%-25% der Innenfläche des Erythrozyten mit Hämoglobin bedeckt sind. In der Literatur finden sich auch Angaben von $3,5 \times 10^6$ Bindungsstellen pro Erythrozyt (MITCHELL et al., 1965). Das bedeutet, daß die Angabe von 25% bedeckter Fläche eher nach oben zu korrigieren ist. Bei diesen Größenordnungen ist es nicht auszuschließen, daß das membrangebundene Hämoglobin eine Rolle in der Gasaustauschfunktion des gesamten Erythrozyten spielt; denn alle Gase müssen die Membran passieren.

Die Reaktion eines Enzyms mit seinem Substrat gleicht der Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin. Die Sättigung des Enzyms mit dem Substrat ist proportional dem Substratumsatz, der gemessen werden kann. Das aktive Zentrum des Enzyms entspricht dem sauerstoffbindenden Häm. Die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms wird durch allosterische Effektoren stark beeinflusst, vergleichbar den Effektoren H^+ , CO_2 , DPG beim Hämoglobin. Die Auftragung der Umsatzgeschwindigkeit gegen die Substratsättigung solcher Enzyme zeigt in vielen Fällen wie die Sauerstoffbindungskurve einen sigmoiden Verlauf, der durch kooperative Wechselwirkungen zwischen den Bindungsstellen erklärt wird. Viele Enzyme sind an biologische Membranen gebunden und können erst so ihre Funktion erfüllen.

Wie oben beschrieben, ist auch Hämoglobin zum Teil an eine Membran gebunden. Das Hämoglobin kann also als Modell dienen für die Beeinflussung der funktionellen Eigenschaften eines Proteins durch die Bindung an eine biologische Membran und umgekehrt, wie weiter oben an der Abhängigkeit der Ionen- Permeabilitäten vom Sauerstoffpartialdruck ausgeführt, als Modellfall für die Wirkung kleiner Moleküle auf Membraneigenschaften.

Hämoglobin bietet den großen Vorteil, daß seine Absorptionseigenschaften für sichtbares Licht mit der Sauerstoffanlagerung verändert werden. Die photometrische Messung von Sauerstoffbindungskurven ist eine Methode mit hoher Reproduzierbarkeit. Zudem sind Hämoglobin und Erythrozytenmembranen relativ leicht in ausreichender Menge zu gewinnen.

Es ist das Ziel dieser Arbeit, die Eigenschaften der Sauerstoffbindung des membrangebundenen Hämoglobins zu untersuchen. Als direkter Vergleich und "Nullversuch" dient eine Lösung freien Hämoglobins, deren Konzentration mit der Hämoglobinkonzentration der Membransuspension übereinstimmt. Die Effekte von H^+ -Ionen, Kohlendioxid und 2,3-Diphosphoglycerat können so an beiden Systemen unter identischen Bedingungen gemessen und miteinander verglichen werden.

II. Methodik

1. Das Ionenmilieu

Lagert man frisches Venenblut bei einer Temperatur von 37°C, so läuft die Glykolyse im Erythrozyten weiter. Die organischen Phosphate 2,3-Diphosphoglycerat und ATP werden abgebaut (SIGGAARD-ANDERSEN, 1971), andererseits entstehen saure Valenzen. Die Konzentrationsänderungen dieser wichtigen Effektoren bewirken systematische Verlagerungen der Sauerstoffbindungskurve. Trägt man den Halbsättigungsdruck in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Blutentnahme auf, so findet man folgendes charakteristisches Verhalten: Der Halbsättigungsdruck steigt in den ersten 3-4 Stunden um 2-3 mmHg auf einen maximalen Wert von 27,5 mmHg und fällt anschließend wieder ab; nach 24 Stunden sind die Stoffwechselvorgänge zur Ruhe gekommen, das System und mit ihm die Lage der Sauerstoffbindungskurve sind jetzt stabil (BARNIKOL et al., 1974; BARNIKOL et al., 1978).

Es wurde versucht, das Ionenmilieu der bei 37°C inkubierten Erythrozyten, das die stabile Lage der Sauerstoffbindungskurve gewährleistet, zu simulieren; zu diesem Zweck wurde eine wässrige Lösung folgender Ionenkonzentrationen angesetzt:

K^+	:	114,4 mmol/l
Na^+	:	16,8 mmol/l
Mg^{++}	:	4,6 mmol/l
Cl^-	:	107,6 mmol/l
HCO_3^-	:	16,8 mmol/l
HPO_4^{--}	:	8,0 mmol/l

Die Ionenkonzentrationen sind entnommen aus: Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage 1969. Es finden sich dort Angaben über Ionenkonzentrationen pro Liter Erythrozyten. Da der Erythrozyt ca. 30 Vol% Hämoglobin enthält, sind die Angaben der Geigy-Tabellen mit 1,4 zu multiplizieren, um die Ionenkonzentrationen des freien Erythrozytenwassers zu erhalten. Da im inkubierten Erythrozyten die organischen

Phosphate DPG und ATP abgebaut sind und anorganisches Phosphat abgespalten haben, enthält die Lösung 8 mmol/l anorganisches Phosphat. Die intraerythrozytäre Konzentration des anorganischen Phosphats im inkubierten Blut wurde folgendermaßen gemessen: Venenblut wurde 24 Stunden lang bei 37°C belassen, die gepackten Erythrozyten anschließend durch Ausfrieren hämolysiert, das Hämolysat 1/2mal mit destilliertem Wasser verdünnt und das freie Wasser des Hämolysats durch Ultrafiltration gewonnen (Micro-Thin-Channel Ultrafiltration System TCF 2, Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts; Diaflo^R Ultrafiltration Membrane PM 10). Die Phosphatkonzentration wurde mit der Molybdat-Vanadat-Reaktion (Test-Combination Phosphor/Phospholipide, Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica) bestimmt.

Um das oben angegebene Ionenmilieu einzustellen, wurden folgende Salze mit folgenden Konzentrationen eingewogen:

NaHCO ₃	16,8 mmol/l
MgCl ₂	4,6 mmol/l
KCl	98,4 mmol/l
K ₂ HPO ₄	8,0 mmol/l

Das oben angegebene Ionenmilieu wurde stets als Lösungsmittel verwendet. Es simuliert also die Verhältnisse im inkubierten Erythrozyten und soll daher im folgenden "intraerythrozytär" genannt werden. Aus den dargestellten Stabilitätsgründen wurden sowohl die Membransuspensionen als auch die Hämoglobininlösungen so präpariert, daß sie die intraerythrozytären Ionenkonzentrationen enthielten.

2. Präparation der Membransuspension

Venenblut wird entnommen und mit Heparinlösung (Thrombophob^R, Nordmark-Werke GmbH, Hamburg) vermischt (Volumenverhältnis 50 : 1). Das Blut wird zentrifugiert (20 Minuten mit 18000 g), das Plasma verworfen und die gepackten Erythrozyten mittels flüssigen Stickstoffs ausgefroren. Das gewonnene Erythrolysat wird mit intraerythrozytärer Lösung etwa im Verhältnis 1 : 10 aufgeschwemmt und wieder zentrifugiert. Die Erythrozytenmembranen setzen sich ab, der Überstand enthält herausgelöstes Hämoglobin und wird verworfen. Diese Waschung mit intraerythrozytärer Lösung wird zehnmal wiederholt. Der Überstand ist nun frei von Hämoglobin. Gewonnen werden die gepackten Membranbruchstücke mit dem gebundenen Hämoglobin, eine zartrosa Masse von zähflüssiger Konsistenz.

Die Abbildung 1 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Membranbruchstücke. Man erkennt kugelige Gebilde, deren Durchmesser zwischen 0,4 μm und 2 μm variieren.

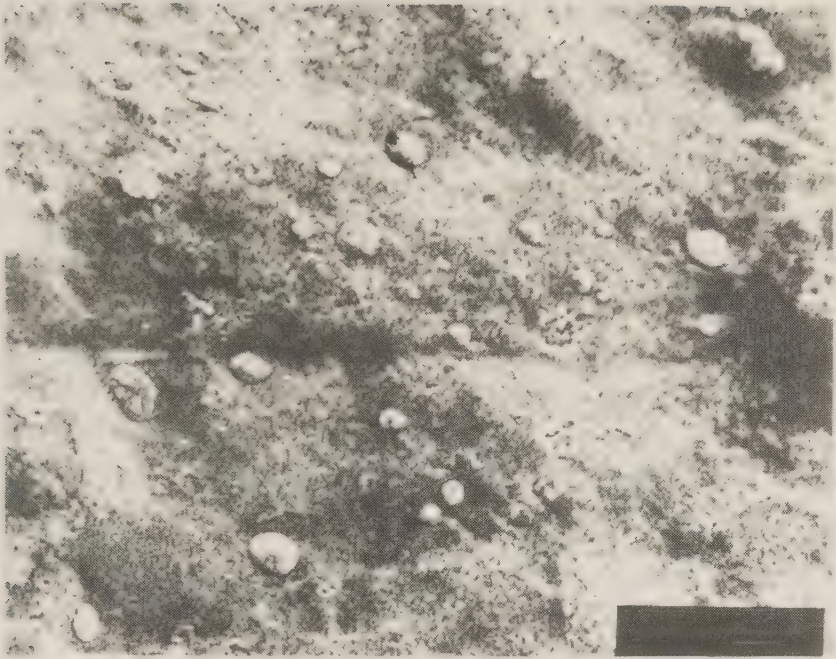


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Membranbruchstücke (Maßstab: $\frac{1}{2} \mu\text{m}$ 9 mm $\approx$ 2 μm)
(Die Aufnahme wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. Krahn, Anatomisches Institut der Universität Mainz, angefertigt.)

Die Membranen werden im Laufe der Präparation 10 mal im Verhältnis 1 : 10 aufgeschwemmt; man kann also sicher sein, daß freies Hämoglobin und die organischen Phosphate ATP und DPG praktisch vollständig ausgewaschen sind. Ebenso kann man annehmen, daß die Ionenkonzentrationen der Membransuspension bezogen auf die freie Lösung mit den gewünschten intraerythrozytären Konzentrationen übereinstimmen.

Zur Bestimmung der Hämoglobinkonzentration der Membransuspension werden die Membranen mit einem Detergenz (Triton X-100, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) aufgelöst und anschließend die Konzentration mit der Cyanhämglobin-Methode (Merckotest^R Hämoglobin, Diagnostica Merck, Darmstadt) bestimmt. Sie beträgt bis zu 1 g Hämoglobin in 100 ml Membransuspension. Kontrollversuche zeigen, daß Triton X-100 in den verwendeten Konzentrationen die Cyanhämglobin-Methode nicht wesentlich beeinflusst.

Aus der Ausbeute an Membransuspension und ihrer Hämoglobinkonzentration läßt sich abschätzen, daß etwa 0,6% bis 2% des gesamten Hämoglobins des Erythrozyten an die Membran gebunden sind. Das bedeutet, daß ein Erythrozyt zwischen $1,7 \cdot 10^6$ und $5,6 \cdot 10^6$ Membranbindungsstellen für Hämoglobin besitzt. In der Literatur finden sich Zahlen von $1,2 \cdot 10^6$ Bindungsstellen (SHAKLAI et al., 1977) und $3,5 \cdot 10^6$ Bindungsstellen (MITCHELL et al., 1965). Alle Angaben liegen im gleichen Größenordnungsbereich.

Die Membransuspensionen werden für die Versuche bei 4°C aufbewahrt, aber niemals länger als 2 Tage.

3. Präparation der Hämoglobinlösungen

Als direkten Vergleich zum membrangebundenen Hämoglobin soll eine Hämoglobinlösung untersucht werden. Sie wird wie folgt präpariert:

Es werden 10 ml Venenblut entnommen, mit Heparinlösung (Thrombophob^R, Nordmark-Werke GmbH, Hamburg) vermischt (Volumenverhältnis 50 : 1) und zentrifugiert (20 Minuten mit 18000 g). Das Plasma wird verworfen und die Erythrozyten mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Nach nochmaligem Zentrifugieren werden die Erythrozyten mit flüssigem Stickstoff ausgefroren. Die hämolysierten Erythrozyten werden mit intraerythrozytärer Lösung aufgeschwemmt und zentrifugiert (20 Minuten mit 18000 g). Am Boden setzen sich die Membranen ab; der Überstand enthält das herausgelöste Hämoglobin, wird in

ein Ultrafiltrationsgerät überführt (High-Performance-Thin-Channel Ultrafiltration System TCF 10, Amicon Corporation, Lexington, Massachusetts; Diaflo Ultrafiltration Membrane PM 10) und mit intraerythrozytärer Lösung aufgefüllt. Die Ultrafiltration wird insgesamt viermal durchgeführt. So ist gewährleistet, daß die Ionenkonzentrationen der schließlich gewonnenen Hämoglobinlösung mit den intraerythrozytären Ionenkonzentrationen übereinstimmen. Die organischen Phosphate ATP und DPG sind auf ca. 0,1% ihrer Ausgangskonzentration verdünnt und spielen keine Rolle mehr.

Die Ultrafiltration wird bei 4°C durchgeführt. Eine Methämoglobin-Bestimmung (RICHTERICH, 1965; EVELYN, MALLOY, 1938) sofort nach der Präparation ergab einen Anteil von annähernd 5%. Die Hämoglobinlösung wurde in Eppendorfgläser abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt. Die Messungen erfolgten innerhalb der folgenden zwei Wochen, so daß der Methämoglobingehalt nicht wesentlich ansteigen konnte.

Zu jedem Versuch wird ein Aliquot der Hämoglobinlösung aufgetaut und mit intraerythrozytärer Lösung auf eine Hämoglobinkonzentration von 1 g pro 100 ml verdünnt. Diese Konzentration entspricht der Hämoglobinkonzentration der Membransuspension.

4. Die pH-Werte

Um den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Sauerstoffbindungskurve zu messen, wird der pH-Wert von Membransuspension und Hämoglobinlösung durch Salzsäure und Kalilauge variiert:

a) Membransuspensionen:

Kleinere pH-Verschiebungen lassen sich durch Zusatz von 0,1 molarer HCl bzw. KOH leicht erreichen. Die zugesetzten Volumina sind kleiner als 5% des Gesamtvolumens und stören daher die Konzentrationen der Membranen und Ionen nicht merklich. Größere pH-Änderungen

werden bewirkt, indem man der intraerythrozytären Lösung 0,5 molare HCl zufügt; die Membransuspension wird mit einem gleichen Volumen dieser Lösung aufgeschwemmt und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, und man behält die angesäuerten Membranen zurück.

Dem Alkalisieren der Membranen sind enge Grenzen gesetzt ($\Delta \text{pH} \leq 0,1$); bei größerem Laugenzusatz verflüssigt sich die vorher zähe Suspension und wird dunkel.

b) Hämoglobinlösungen:

Wie in Kapitel II,3 beschrieben, wird für jeden Versuch die Hämoglobinlösung mit intraerythrozytärer Lösung auf die gewünschte Konzentration von 1 g in 100 ml verdünnt. Zur pH-Änderung setzt man der intraerythrozytären Lösung vor dem Verdünnen 0,5 molare HCl bzw. KOH zu.

Membransuspensionen und Hämoglobinlösungen werden mit dem gewünschten Gas (1% CO₂ bzw. 5,6% CO₂ bzw. 10% CO₂, Rest O₂) äquilibriert (Äquilibriereinrichtung des BMS 2 MK 2 Blood Micro System, Radiometer Copenhagen) und die pH-Werte mit einer Glaselektrode gemessen.

5. 2,3-Diphosphoglycerat

2,3-Diphosphoglycerat kann bezogen werden als Pentacyclohexylammoniumsalz ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_{10}\text{P}_2 \cdot (\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N})_5 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) bei der Firma Boehringer Mannheim GmbH. Mit einer wässrigen Lösung des Salzes wird die gewünschte DPG-Konzentration in der Membransuspension bzw. Hämoglobinlösung eingestellt. Der Volumenzusatz beträgt ca. 4% des Gesamtvolumens.

6. Die Gase

Zur pH-Messung werden die Äquilibriergase aus reinem Sauerstoff und Kohlendioxid mit einer Mischpumpe (H.Wösthoff OHG, Bochum) hergestellt.

Die Gase zur Messung der Sauerstoffbindungskurve werden in einer Gasmischanlage hergestellt und ihr Gehalt nach der Methode von SCHOLANDER (1947) bestimmt.

7. Die Messung der Sauerstoffbindungskurve

a) Die Meßapparatur

W. NIESEL und G. THEWS veröffentlichten 1961 ein neues, photometrisches Verfahren zur genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des Blutes und konzentrierter Hämoproteidlösungen (NIESEL und THEWS, 1961). Diese Meßmethode wurde von BARNIKOL und Mitarbeitern (1978) weiterentwickelt. Sie bietet folgende Vorteile, die sie zur einzig möglichen Methode für die Untersuchung der Membransuspensionen machen: die kontinuierliche Messung der Sauerstoffsättigung von 0% bis 100% und insbesondere die Verwendung von Mikromengen.

Abbildung 2 zeigt ein Schema der Meßapparatur.

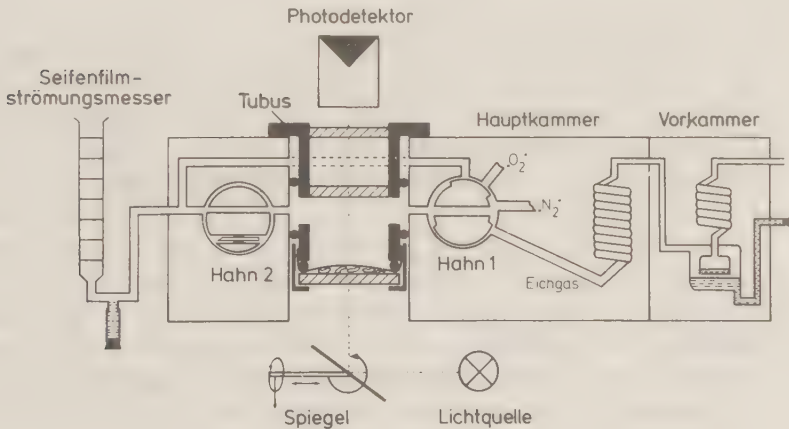


Abb. 2: Schema der Meßapparatur

Zur Messung von Sauerstoffbindungskurven benötigt man drei verschiedene Gasgemische: Stickstoff, Sauerstoff und ein Eichgas mit einem jeweils gleichen Anteil an CO_2 . Diese Gase werden in die Vorkammer eingeleitet, in einer Spirale auf $35,5^\circ\text{C}$ erwärmt und zur Befeuchtung mittels einer Fritte über eine Wasseroberfläche gespreitet. Das wasserdampfgesättigte Gas gelangt nun in die Hauptkammer und wird in einer zweiten Spirale auf 37°C erwärmt. Die Apparatur besitzt für jedes Gas eine eigene Zuleitung, also insgesamt drei. Mit Hilfe von Hahn 1 kann eines der drei Gase ausgewählt und der Meßkammer zugeführt werden.

Die Meßkammer selbst ist ein herausnehmbarer Tubus. Dort befindet sich die Probe, ausgebreitet zwischen einem Deckglas (Abschluß zur Außenwelt) und einer gespannten Polytetrafluoräthylenmembran (Abschluß zum Gasraum). Diese Membran gewährleistet, daß die Probe weder austrocknet noch verdünnt wird; andererseits ist sie so dünn, daß die Äquilibriumsgase praktisch ungehindert durchtreten können. Der Gasraum wird nach oben durch ein Doppelfenster abgeschlossen.

Der Tubus und mit ihm die Probe werden von monochromatischem Licht (Hg-Linie mit Interferenzfilter herausgefiltert) durchstrahlt. Auf dem Tubus wird ein Photodetektor befestigt (Einstrahlphotometer der Fa. Netheler & Hinz GmbH, Hamburg). Auf diese Weise können Änderungen der Transmission in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung der Probe registriert werden. Es wird Licht der Wellenlänge 578 nm verwendet. Frühere Versuchsreihen ergaben, daß mit dieser Wellenlänge richtige Sauerstoffbindungskurven am Vollblut und Erythrolysat gemessen werden (WAHLER, 1976). Das Meßsignal des Photodetektors wird auf einem Schreiber registriert; zusätzlich wird es kompensiert und die verstärkte Meßdifferenz gesondert aufgezeichnet.

In den Gasraum ragt eine Sauerstoffelektrode hinein (Fa. Beckmann Instruments GmbH, Hamburg, entnommen aus dem Glucoseanalysator). Mit ihrer Hilfe wird der Sauerstoffpartialdruck in der Meßkammer registriert.

Hahn 2 leitet den Gasstrom aus der Apparatur heraus. Der Strom kann noch mit einem Seifenfilmmesser auf etwa 1 ml/s einreguliert werden. Bei zu kleiner Strömungsgeschwindigkeit beschlagen die Fenster. Bei zu großem Gasfluß trocknet die Schicht aus; zusätzlich baut sich ein Überdruck in der Kammer auf, die Partialdrucke der Gase wären nicht mehr zu bestimmen.

Die bis jetzt beschriebenen Teile der Apparatur dienen der Oxygenierung, der Desoxygenierung und der Eichung der Probe. Die eigentliche Sauerstoffbindungskurve wird wie folgt gemessen: Hahn 1 bietet die Möglichkeit, den Sauerstoffstrom an der Kammer vorbeizuleiten. Diese ist jetzt von jedem Gasstrom abgeschnitten. Damit der Sauerstoff nicht durch Hahn 2 schwallartig eindiffundiert, wird dieser umgeschaltet und ein feines Nadelventil, ein Diffusionshindernis, in den Weg gelegt. Der Sauerstoff sickert so langsam in die Kammer ein. Der Sauerstoffpartialdruck in der Kammer steigt nach den Diffusionsgesetzen exponentiell an; am Anfang ist der Anstieg praktisch linear. Die Probe wird gemäß ihrer Bindungskurve durch den steigenden Sauerstoffpartialdruck aufgesättigt und die Transmission fortlaufend registriert.

b) Registrierung und Auswertung der Bindungskurve

Abbildung 3 zeigt die Originalregistrierung einer Sauerstoffbindungskurve mit einer Eichung. I bezeichnet die Registrierung der Transmission; II zeigt die Transmission, nachdem sie kompensiert und aufgespreizt ist.

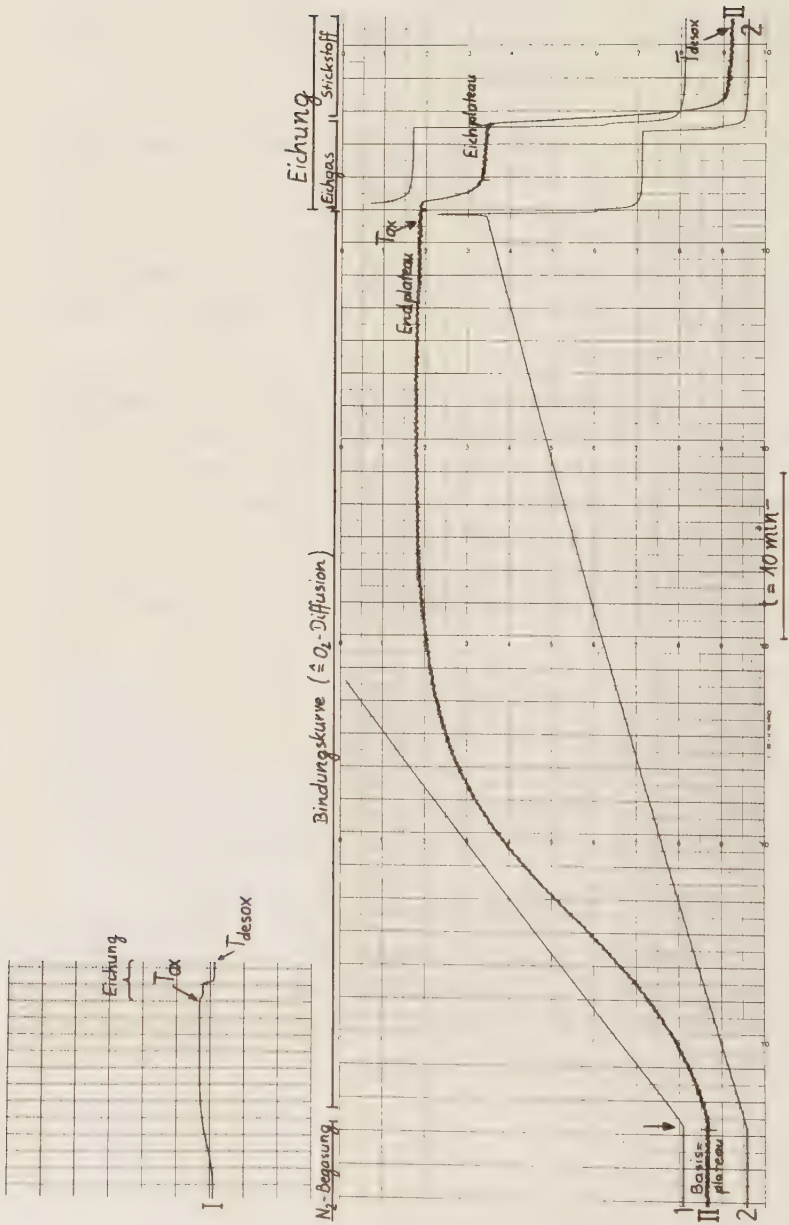


Abb. 3: Originalregistrierung einer Sauerstoffbindungskurve: I = Transmission;
 II = gespreizte Transmission; 1 und 2 = Signal der Sauerstoffelektrode
 (Erläuterung im Text).

Das Experiment läuft wie folgt ab: Die Probe ist mit dem N_2 - CO_2 -Gas voll desoxygeniert, das Basisplateau wird geschrieben. Der Pfeil bezeichnet den Zeitpunkt, an dem durch Umlegen der Hähne 1 und 2 der Diffusionsvorgang und die Aufzeichnung der Kurve beginnt. Sobald die Probe voll oxygeniert ist, stellt sich das Endplateau ein. Die Bindungskurve ist durchlaufen. Nun erfolgt die Eichung: Die Probe wird mit einem Eichgas bekannter Zusammensetzung (CO_2 , N_2 , O_2) äquilibriert und nach Erreichen des Eichplateaus mit Stickstoff desoxygeniert.

Wie man erkennt, sind die Plateaus keine konstanten Werte, sondern zeigen eine Drift. Diese Driften werden bei der Auswertung berücksichtigt, indem man sie graphisch über den gesamten Kurven -bzw. Eichverlauf linear extrapoliert.

Aus I entnimmt man die Transmission für den voll oxygenierten und desoxygenierten Zustand (T_{ox} und T_{desox}). Man überträgt die beiden Werte auf II und kann nun die Transmission für jeden beliebigen Punkt der Kurve ermitteln; die Transmission des Eichplateaus wird analog bestimmt.

Die Sättigung wird folgendermaßen berechnet:

$$(1) \quad T = \frac{I}{I_0}$$

T = Transmission, I = gemessene Intensität

I_0 = Intensität bei Aqua dest.

$$(2) \quad E = -\lg T$$

E = Extinktion

$$(3) \quad S = \frac{C_{HbO_2}}{C_O}$$

S = Sättigung, C_{HbO_2} = Konzentration der oxygenierten Bindungsstellen, C_O = Konzentration der gesamten Bindungsstellen

Aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgt:

$$(4) \quad E_{\text{HbO}_2} = \epsilon_{\text{HbO}_2} \cdot S \cdot c_{\text{O}} \cdot d$$

E_{HbO_2} = Anteil der Extinktion, der durch oxygeniertes Hb verursacht ist; ϵ_{HbO_2} = Extinktionskoeffizient des oxygenierten Hämoglobins; d = Schichtdicke

$$(5) \quad E_{\text{Hb}} = \epsilon_{\text{Hb}} (1 - S) c_{\text{O}} \cdot d$$

E_{Hb} = Anteil der Extinktion, der durch desoxygeniertes Hb verursacht ist; ϵ_{Hb} = Extinktionskoeffizient des desoxygenierten Hämoglobins

$$(6) \quad E = E_{\text{HbO}_2} + E_{\text{Hb}}$$

$$(7) \quad E = \epsilon_{\text{HbO}_2} \cdot S \cdot c_{\text{O}} \cdot d + \epsilon_{\text{Hb}} \cdot (1 - S) \cdot c_{\text{O}} \cdot d$$

$$(8) \quad E_{\text{O}_2} = \epsilon_{\text{HbO}_2} \cdot c_{\text{O}} \cdot d$$

E_{O_2} = Extinktion des Endplateaus

$$(9) \quad E_{\text{N}_2} = \epsilon_{\text{Hb}} \cdot c_{\text{O}} \cdot d$$

E_{N_2} = Extinktion des Basisplateaus

Aus (7), (8), (9) folgt

$$(10) \quad E = E_{\text{O}_2} \cdot S + E_{\text{N}_2} (1 - S)$$

$$(11) \quad E = S (E_{\text{O}_2} - E_{\text{N}_2}) + E_{\text{N}_2}$$

$$(12) \quad S = \frac{E - E_{N_2}}{E_{O_2} - E_{N_2}}$$

1 zeigt das Meßsignal der Sauerstoffelektrode. Man kann den Eintritt des Sauerstoffs in die Meßkammer und damit den Beginn der Kurve exakt festlegen. Zudem sieht man, daß der Sauerstoff praktisch linear eindiffundiert und erst gegen Ende der Kurve von der Geraden abweicht. Kleinste Störungen des Diffusionsvorganges, die sich im Verlauf der Transmission niemals zu erkennen geben, können so bemerkt werden. 2, ebenfalls eine Aufzeichnung des Meßsignals der Elektrode, nur minder verstärkt, erlaubt die Kontrolle des Diffusionsvorganges über den gesamten Kurvenverlauf.

Die Sättigung läßt sich aus den Transmissionen berechnen, den zugehörigen Sauerstoffpartialdruck kann man auf zwei Arten ermitteln:

Die O_2 -Elektrode wird vor und nach der Kurve mit dem Eichgas geeicht. Die Elektrode ist über die Meßzeit sehr stabil. Man sucht den Zeitpunkt der Kurve auf, an dem die Elektrodenregistrierung genau ihren Eichwert erreicht. Jetzt herrscht der Sauerstoffpartialdruck des Eichgases, den man exakt kennt. Unter der Voraussetzung, daß der Sauerstoff linear eindiffundiert, hat man die Zeitachse in eine PO_2 -Achse umgeiecht.

Aus der Transmission des Eichplateaus berechnet man die Sättigung, die sich beim Sauerstoffpartialdruck des Eichgases einstellt. Dann sucht man eben diese Sättigung in der Kurve auf. Dort herrscht der Sauerstoffpartialdruck des Eichgases. Man hat wiederum die Zeitachse in eine PO_2 -Achse umgeiecht.

c) Genauigkeit und Reproduzierbarkeit des Meßverfahrens

Die Genauigkeit der photometrischen Meßmethode wurde mit einem unabhängigen Verfahren überprüft: Van Slyke-Methode (WAHLER, 1975; BARNIKOL et al., 1978). Bei 578 nm mißt das photometrische Verfahren am Vollblut richtige Sauerstoffbindungskurven. Dies ist bemerkenswert, da eine unabdingbare Voraussetzung für die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes, nämlich die Homogenität des Mediums, bei Erythrozyten und Membransuspensionen nicht erfüllt ist. BARNIKOL schreibt (BARNIKOL et al., 1978): "Seit langem ist bekannt, daß für Erythrozytensuspensionen das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht gilt (KRAMER et al., 1951). Dies beruht überwiegend auf Streuung an Zellteilchen. Von dieser Vorstellung ausgehend, leitete TWERSKY (1970) eine Beziehung für die Extinktion ab, deren Gültigkeit für Erythrozyten von ANDERSON und SEKELJ (1967) bestätigt wurde. Danach setzt sich die Extinktion einer Erythrozytensuspension additiv aus einem Lambert-Beer-Term und einem Streuterm zusammen. Der Streuterm hängt ab von der optischen Weglänge, von der Wellenlänge, vom Hämatokrit, von der Geometrie des Photodetektors, von der Partikelgröße, von der Partikelform und von der Orientierung der streuenden Teilchen. Alle diese Parameter werden bei der oben beschriebenen Methode konstant gehalten. Berechnet man, wie oben angegeben, die O₂-Sättigung, so fällt der konstante Streuterm heraus." Dies gilt insbesondere auch für die Membransuspensionen.

Da die meßtechnischen Möglichkeiten der Apparatur, was Photodetektor und Verstärker betrifft, im Augenblick begrenzt sind, muß im Falle geringer Hämoglobinkonzentrationen, wie sie bei den Membransuspensionen vorgegeben sind, die Schichtdicke der Probe über das sonst übliche Maß von 10 - 20 µm gesteigert werden. Nur so kann man einen genügend großen Meßeffect erzielen. Eine verbreiterte Schichtdicke ist aber gleichbedeutend mit verlängerten Diffusionswegen und -zeiten in der Schicht. Strömt nun der Sauerstoff

zu schnell in die Kammer, so steht die Probe mit dem Gasraum nicht mehr im Gleichgewicht. Die Sauerstoffsättigung hinkt dem Sauerstoffpartialdruck hinterher. Man mißt falsche Bindungskurven. Daher muß besonderes Augenmerk darauf gerichtet werden, daß der Sauerstoffpartialdruck langsam genug ansteigt, damit die Probe in jedem Augenblick im Gleichgewicht mit dem Gasraum steht.

Die Standardabweichung der Methode, bestimmt an fünf Messungen der Bindungskurve einer Versuchsperson, beträgt für den Halbsättigungsdruck einer Blutschicht etwa 0,5 mmHg bei einem Mittelwert von 25,5 mmHg (BARNIKOL et al., 1978).

Da oxygeniertes Hämoglobin eine stärkere Säure als desoxygeniertes ist (vgl. Kapitel III), führt die Registrierung einer Sauerstoffbindungskurve zur Ansäuerung der Hämoglobinprobe in der Meßkammer. Dieser Effekt ist direkt abhängig von der Hämoglobinkonzentration, denn bei hohen Hämoglobinkonzentrationen werden proportional mehr H^+ -Ionen freigesetzt.

Das Ausmaß der Ansäuerung der Hämoglobinprobe durch Oxygenierung wurde wie folgt gemessen: Eine wässrige Hämoglobinlösung mit den intraerythrozytären Ionenkonzentrationen wurde im Laue-Tonometer mit einem Stickstoff-Kohlendioxid- oder Sauerstoff-Kohlendioxid-Gasgemisch (jeweils 5,6Vol% CO_2 = 40 mmHg) desoxygeniert bzw. oxygeniert und der pH-Wert der Lösung gemessen. Die vollständige Desoxygenation wurde mit einem Lex- O_2 -Con-TL (Lexington Instruments Corporation) überprüft.

Bei einer Hämoglobinkonzentration von 8 g/100 ml ergab sich im desoxygenierten Zustand ein pH-Wert von 7,232 ($\sigma = 0,003$) und im oxygenierten Zustand ein pH-Wert von 7,202 ($\sigma = 0,003$), d.h. eine sicher meßbare Ansäuerung.

Bei einer Hämoglobinkonzentration von 1 g/100 ml, die bei allen Versuchen dieser Arbeit verwendet wurde, war eine Ansäuerung nicht mehr nachweisbar. Es wurden folgende Werte gemessen: $\text{pH}_{\text{desox}} = 7,330$ ($\sigma = 0,005$), $\text{pH}_{\text{ox}} = 7,330$ ($\sigma = 0,010$) und $\text{pH}_{\text{desox}} = 7,284$ ($\sigma = 0,003$), $\text{pH}_{\text{ox}} = 7,285$ ($\sigma = 0,005$).

Das Fehlen einer meßbaren Ansäuerung kann mit der geringen Hämoglobinkonzentration von 1 g/100 ml erklärt werden; zusätzlich hat das Ionenmilieu auf Grund des Gehaltes an HCO_3^- - und HPO_4^{--} -Ionen puffernde Eigenschaften.

Die Konstanz des pH-Wertes während der Sättigung des Hämoglobins mit Sauerstoff ist eine wichtige Voraussetzung für die korrekte Interpretation der Meßergebnisse.

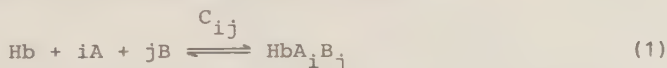
III. Ergebnisse und Diskussion

1. Die reziproken Beziehungen

Das Hämoglobin besitzt die Fähigkeit, eine Reihe von kleinen Molekülen (u.a. O_2 , CO_2 , H^+ , 2,3-Diphosphoglycerat) reversibel zu binden. Das Experiment zeigt, daß sich die Bindungen dieser Liganden gegenseitig beeinflussen: So behindert z.B. die Bindung von CO_2 oder DPG die Sauerstoffbindung (ersichtlich an einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve); umgekehrt bewirkt die O_2 -Anlagerung, daß CO_2 und DPG erschwert an Hämoglobin gebunden werden. Diese Tatsache der wechselseitigen Einflußnahme der Liganden ist eine Folge des Massenwirkungsgesetzes und wurde von WYMAN (1964) theoretisch untersucht und in Gleichungen gefaßt.

Im englischen Sprachgebrauch werden WYMAN's Gleichungen "linkage equations" oder "linked functions" genannt. Dies läßt sich sinnvoll übersetzen mit "Gleichungen der wechselseitigen Ligandenwirkungen" oder "reziproke Beziehungen".

Die Bindung zweier Liganden A und B an das Hämoglobinmolekül läßt sich allgemein formulieren:



Die maximale Anzahl der Bindungsstellen pro Hämoglobinmolekül für den Liganden A bzw. B soll p bzw. q betragen. Die Sättigung S eines Liganden ist definiert als Verhältnis der besetzten Bindungsstellen zur Gesamtzahl der Bindungsstellen. Es ergibt sich die Sättigung:

$$S_A = \frac{\frac{1}{P} \sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q i \cdot [HbA_iB_j]}{\sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q [HbA_iB_j]} \quad (2)$$

bzw.

$$S_B = \frac{\frac{1}{q} \cdot \sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q j \cdot [\text{HbA}_i\text{B}_j]}{\sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q [\text{HbA}_i\text{B}_j]}$$

Aufgrund des Massenwirkungsgesetzes ergibt sich aus Gleichung (1):

$$c_{ij} = \frac{[\text{HbA}_i\text{B}_j]}{[\text{Hb}] \cdot [\text{A}]^i \cdot [\text{B}]^j} \quad (3)$$

(c_{ij} = Gleichgewichtskonstante)

Aus (2) und (3) folgt:

$$S_A = \frac{\frac{1}{p} \cdot \sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q i \cdot [\text{A}]^i \cdot [\text{B}]^j}{\sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q [\text{A}]^i \cdot [\text{B}]^j} \quad (4)$$

bzw.

$$S_B = \frac{\frac{1}{q} \cdot \sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q j \cdot [\text{A}]^i \cdot [\text{B}]^j}{\sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q [\text{A}]^i \cdot [\text{B}]^j}$$

Man definiert eine Hilfsfunktion $y = \sum_{i=0}^p \sum_{j=0}^q [\text{A}]^i \cdot [\text{B}]^j$ und kann durch Differenzieren zeigen, daß gilt:

$$p \cdot S_A = \frac{\partial \ln Y}{\partial \ln [A]} \quad \text{bzw.} \quad q \cdot S_B = \frac{\partial \ln Y}{\partial \ln [B]} \quad (5)$$

Durch Differenzieren von (5) erhält man WYMAN's grundlegende Gleichung:

$$p \left(\frac{\partial S_A}{\partial \ln [B]} \right)_{[A]} = q \left(\frac{\partial S_B}{\partial \ln [A]} \right)_{[B]} \quad (6)$$

Da S_A nur von $[A]$ und $[B]$ abhängig ist, gilt:

$$dS_A = \left(\frac{\partial S_A}{\partial \ln [A]} \right)_{[B]} d\ln[A] + \left(\frac{\partial S_A}{\partial \ln [B]} \right)_{[A]} d\ln[B] \quad (7)$$

oder

$$\frac{\partial S_A}{\partial \ln [B]} = \left(\frac{\partial S_A}{\partial \ln [A]} \right)_{[B]} \left(\frac{\partial \ln [A]}{\partial \ln [B]} \right)_{S_A} + \left(\frac{\partial S_A}{\partial \ln [B]} \right)_{[A]} \quad (8)$$

Unter der Voraussetzung, daß S_A konstant ist, gilt:

$$\left(\frac{\partial \ln [A]}{\partial \ln [B]} \right)_{S_A} = - \frac{\left(\frac{\partial S_A}{\partial \ln [B]} \right)_{[A]}}{\left(\frac{\partial S_A}{\partial \ln [A]} \right)_{[B]}} \quad (9)$$

Aus (6) und (9) ergibt sich Gleichung (10)

$$p \left(\frac{\partial \ln [A]}{\partial \ln [B]} \right)_{S_A} = -q \left(\frac{\partial S_B}{\partial S_A} \right)_{[B]} \quad (10)$$

Für die Sauerstoff-Protonen-Wechselwirkung lauten dann die Gleichungen:

$$\left(\frac{\partial \log \text{PO}_2}{\partial \log \text{H}^+} \right)_{\text{S}_{\text{O}_2}, \text{PCO}_2, \text{DPG}} = - \left(\frac{\partial \text{S}_{\text{H}^+}}{\partial \text{S}_{\text{O}_2}} \right)_{\text{H}^+, \text{PCO}_2, \text{DPG}} \quad (11)$$

und

$$\left(\frac{\partial \text{S}_{\text{O}_2}}{\partial \log \text{H}^+} \right)_{\text{PO}_2, \text{PCO}_2, \text{DPG}} = \left(\frac{\partial \text{S}_{\text{H}^+}}{\partial \log \text{PO}_2} \right)_{\text{H}^+, \text{PCO}_2, \text{DPG}} \quad (12)$$

Da das Hämoglobin 4 Moleküle Sauerstoff und 4 Protonen (vgl. Kapitel III.3) bindet, sind p und q gleich 4.

Gleichung (11) in Worten:

Der Bohr-Faktor, definiert als Änderung des logarithmierten Sauerstoffpartialdruckes pro pH-Änderung bei einer konstanten O₂-Sättigung, ist gleich der Änderung der Protonensättigung pro Änderung der Sauerstoffsättigung. Beträgt der Bohr-Faktor z.B. 0,5, so wird durch Anlagerung von 2 Molekülen O₂ im Durchschnitt 1 Proton freigesetzt. Umgekehrt bewirkt die Anlagerung von 1 Proton das Abdissoziieren von durchschnittlich 2 Molekülen Sauerstoff. So lassen sich aus der pH-Abhängigkeit der O₂-Bindungskurve die durchschnittliche Zahl der O₂-abhängigen H-Ionen und umgekehrt aus der O₂-Abhängigkeit der H⁺-Bindungskurve (Titrationskurve) die Zahl der H⁺-abhängigen O₂-Moleküle bestimmen.

Der Bohr-Faktor gibt also nicht nur an, wie stark sich der Sauerstoffpartialdruck einer Hämoglobinprobe durch Ansäuern bzw. Alkalisieren ändert, sondern er ist auch ein molekular interpretierbarer Parameter. Gleichung (11), die sich mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes ableiten läßt, wurde experimentell von TYUMA und UEDA (1975) bestätigt.

Gleichung (12) liefert eine quantitative Beschreibung der Tatsache, daß die Sauerstoffsättigung vom pH-Wert und umgekehrt die Protonensättigung vom Sauerstoffpartialdruck abhängt. Die Änderung der Sauerstoffsättigung durch pH-Änderung bei konstantem PO_2 ist gleich der Änderung der Protonensättigung durch PO_2 -Änderung (PO_2 -Werte logarithmiert) bei konstantem pH-Wert. Auch diese Gleichung wurde von TYUMA und UEDA (1975) experimentell bestätigt.

Für die Sauerstoff-Kohlendioxid-Wechselwirkung gilt analog:

$$\left(\frac{\partial \log PO_2}{\partial \log PCO_2} \right)_{S_{O_2}, H^+, DPG} = - \left(\frac{\partial S_{CO_2}}{\partial S_{O_2}} \right)_{PCO_2, H^+, DPG} \quad (13)$$

und

$$\left(\frac{\partial S_{O_2}}{\partial \log PCO_2} \right)_{PO_2, H^+, DPG} = \left(\frac{\partial S_{CO_2}}{\partial \log PO_2} \right)_{PCO_2, H^+, DPG} \quad (14)$$

p und q sind 4, da die CO_2 -Bindung nur an den 4 N-terminalen Valinen erfolgt (vgl. Kapitel III.3).

Die Gleichungen (11) bis (14) beschreiben wohlbemerkt die sauerstoffabhängige Protonen- bzw. Kohlendioxidbindung; die pH-abhängige Protonenbindung ist die Titrationskurve des Hämoglobins; die PCO_2 -abhängige CO_2 -Bindung ist die Kohlendioxidbindungskurve des Hämoglobins.

WYMAN's Gleichungen lassen sich auf jeden beliebigen Liganden des Hämoglobins anwenden und können zum genaueren Studium molekularer Wechselwirkungen mit dem Akzeptor-Molekül dienen.

2. Die Sauerstoffbindungskurve des membrangebundenen im Vergleich zum gelösten Hämoglobin (Übersicht)

Die Messungen ergeben, daß das membrangebundene Hämoglobin eine Sauerstoffbindungskurve besitzt, die der Bindungskurve des frei gelösten Hämoglobins qualitativ gleicht. Als Beispiel sind in Abb. 4 die Bindungskurven, gemessen an einer Membransuspension und an einer Hämoglobinlösung gegenübergestellt (Tabelle I, 2.3 und Tabelle II, 2.4).

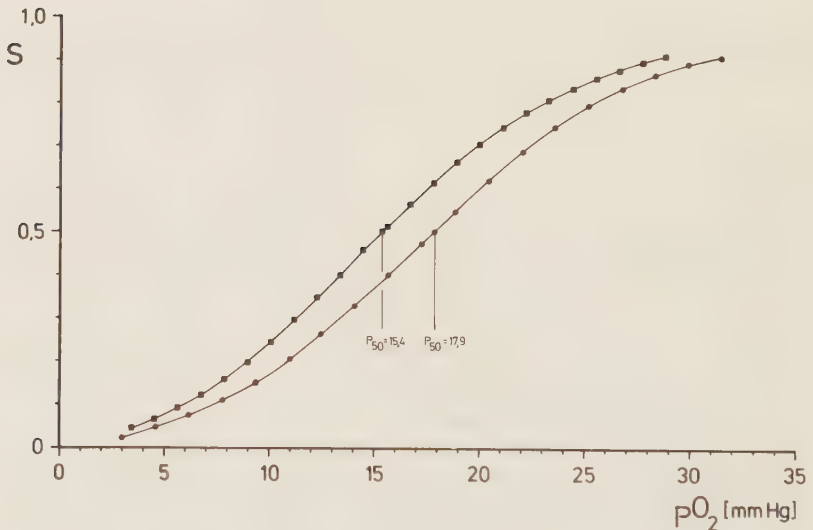


Abb. 4: 2 Sauerstoffbindungskurven, gemessen an freiem und membrangebundenem Hämoglobin.

PCO₂ = 40 mmHg; Temp. = 37°C

● membrangebundenes Hämoglobin; pH = 7,288

■ freies Hämoglobin (1 g/100 ml); pH = 7,312

Abb. 5 zeigt die gleichen Meßwerte in der sogenannten Hill-Auftragung.

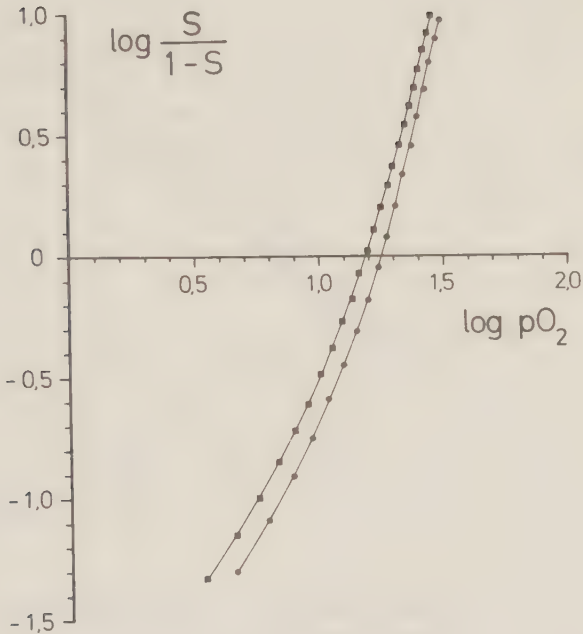


Abb. 5: Hill-Auftragung der Sauerstoffbindungskurven von Abb. 4.

$PCO_2 = 40$ mmHg; Temp. = $37^\circ C$

● membrangebundenes Hämoglobin; pH = 7,288

■ freies Hämoglobin (1g/100 ml); pH = 7,312

Auf den ersten Blick erkennt man, daß beide Hill-Kurven nicht linear sondern nach oben gekrümmt sind; sie sind nicht einfach parallel verlagert, sondern die Kurve des membrangebundenen Hämoglobins läuft grob gesehen steiler.

In Abb. 6 sind Bindungskurven für membrangebundenes und freies Hämoglobin aufgetragen, die mittels der Bohr-Faktoren auf einen pH von 7,2 korrigiert sind (Tabelle IV).

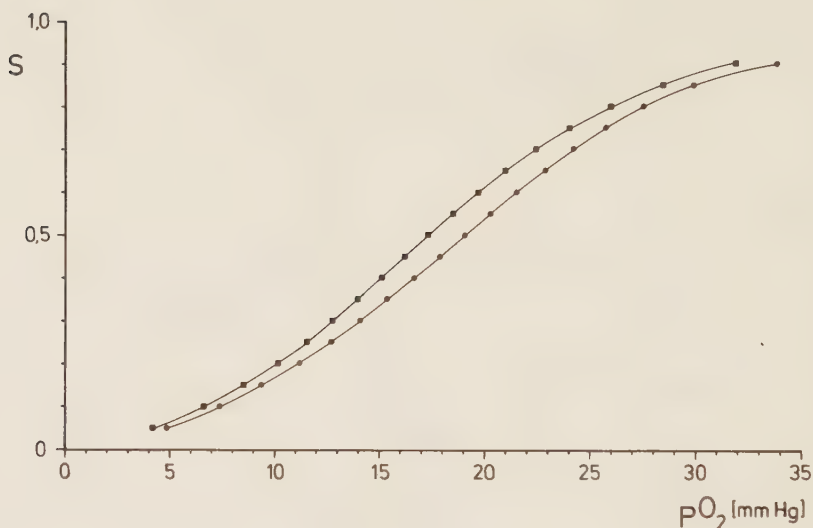


Abb. 6: Sauerstoffbindungskurven, korrigiert auf pH = 7,20
PCO₂ = 40 mmHg; Temp. = 37°C
● membrangebundenes Hämoglobin; pH = 7,20
■ freies Hämoglobin (1g/100 ml); pH = 7,20

Der PCO₂ beträgt 40 mmHg. Man erkennt, daß unter diesen quasi physiologischen Bedingungen die Sauerstoffbindungskurve des membrangebundenen Hämoglobins rechtsverlagert ist. Das bedeutet, daß die Membranbindung die Sauerstoffbindung behindert. Umgekehrt gilt dann, daß die Sauerstoffbindung die Membranbindung erschwert. Es bedeutet, daß bei Oxygenierung die Membranbindung des Hämoglobins gelöst wird.

Bei einem PCO_2 von 70 mmHg und einem pH-Wert von 7,20 sind beide Kurven nicht zu unterscheiden. Membranbindung und Sauerstoffbindung beeinflussen sich bei hohem CO_2 -Partialdruck und bei $\text{pH} = 7,20$ nicht mehr (Abb. 7).

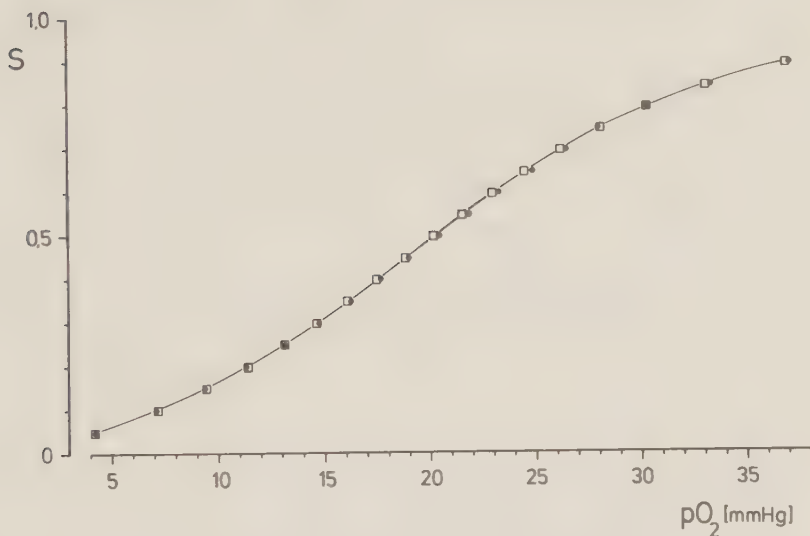


Abb. 7: Sauerstoffbindungskurven, korrigiert auf $\text{pH} = 7,20$
 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; Temp. = 37°C

- membrangebundenes Hämoglobin; $\text{pH} = 7,20$
- freies Hämoglobin (1g/100 ml); $\text{pH} = 7,20$

Bei einem PCO_2 von 7 mmHg ist die Bindungskurve des membrangebundenen Hämoglobins linksverlagert (Abb. 8).

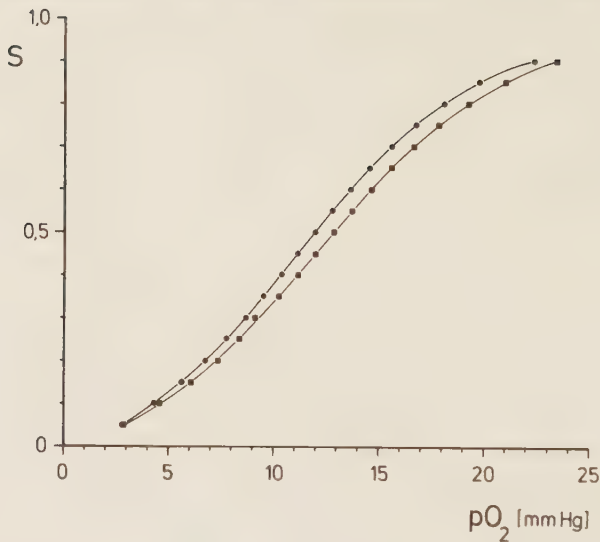


Abb. 8: Sauerstoffbindungskurven, korrigiert auf pH = 7,20
 $PCO_2 = 7$ mmHg; Temp. = 37°C

- membrangebundenes Hämoglobin; pH = 7,20
- freies Hämoglobin (1g/100 ml); pH = 7,20

Das heißt, die Membranbindung erleichtert die Sauerstoffbindung; oder anders ausgedrückt, zwischen Sauerstoffbindung und Membranbindung liegen positiv kooperative, heterologe Wechselwirkungen vor.

Aus diesen Vergleichen wird der starke Einfluß von Kohlendioxid deutlich, denn man findet in Abhängigkeit vom PCO_2 positive und negative heterologe Kooperativität zwischen Membranbindung und Sauerstoffbindung. Im übrigen ist die positive Kooperativität ein seltener Fall.

3. P_{50} -Analyse: Abhängigkeit des Halbsättigungsdruckes von den Effektoren

Der Sauerstoffpartialdruck, bei dem eine Hämoglobinprobe zu 50% gesättigt ist, bezeichnet man als Halbsättigungsdruck P_{50} . Er ist ein anschaulicher Meßwert, der die Lage der Bindungskurve zum Teil beschreibt, und ein Maß für die mittlere O_2 -Affinität (Tabelle V).

- a) Einfluß des pH-Wertes und des CO_2 -Partialdruckes (PCO_2) (H^+ - und CO_2 -Gradient, sogen. Bohr-Faktor und CO_2 -Faktor)

BOHR, HASSELBALCH und KROGH (1904) entdeckten als erste, daß eine Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes eine reversible Verminderung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins bewirkt. Ein erhöhter CO_2 -Partialdruck führt zwangsläufig zu einer Ansäuerung der Blutprobe. Wie später gezeigt wurde, setzt sich der Effekt aus zwei Anteilen zusammen: Sowohl eine erhöhte CO_2 -Konzentration wie auch eine erhöhte Protonenkonzentration führen beide zu einer verminderten Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, oder mit anderen Worten ausgedrückt, sie bewirken eine Rechtsverlagerung der Sauerstoffbindungskurve. Umgekehrt bewirkt eine Sauerstoffanlagerung, daß sich Protonen und CO_2 vom Hämoglobin abspalten. Unter "Bohr-Effekt" versteht man heute nur noch den Einfluß der Protonenkonzentration auf die Sauerstoffbindung (ANTONINI and BRUNORI, 1971; KILMARTIN and ROSSI-BERNARDI, 1973; WEISS-BLUTH, 1974).

Der Bohr-Effekt wird sehr wahrscheinlich durch 4 Aminosäuren vermittelt: die α -Aminogruppe des Valin 1 der beiden α -Ketten und die Imidazolgruppe des Histidin 146 der beiden β -Ketten. Die Bindung der Protonen an das tertiäre Stickstoffatom bewirkt eine Änderung der Konformation des Hämoglobinmoleküls und damit eine veränderte Sauerstoffaffinität (KILMARTIN and ROSSI-BERNARDI, 1973).

Kohlendioxid wird direkt an das Hämoglobin unter Bildung einer Carbaminosäure gebunden.



Die Carbaminosäurebildung erniedrigt ebenfalls durch Änderung der Konformation des Hämoglobins die Sauerstoffaffinität; umgekehrt behindert die Sauerstoffanlagerung die Carbaminosäurebildung. Die Carbaminosäurebildung erfolgt an den 4 N-terminalen Valinen der α - und β -Ketten (KILMARTIN and ROSSI-BERNARDI, 1973).

In Abb. 9 sind die Halbsättigungsdrucke von membrangebundenem und frei gelöstem Hämoglobin logarithmisch in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen.

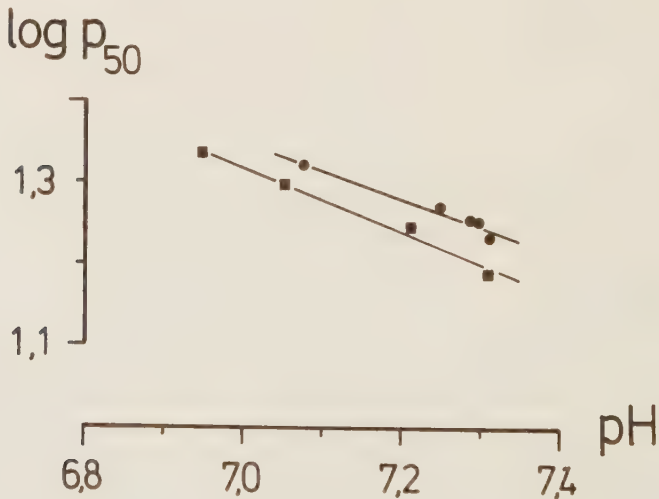


Abb. 9: Halbsättigungsdrucke P_{50} in Abhängigkeit vom pH-Wert

$\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; Temp. = 37°C

● membrangebundenes Hämoglobin

■ freies Hämoglobin (1g/100ml)

Durch die Meßpunkte lassen sich Regressionsgeraden legen. Ihre Steigung ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$), ein direktes Maß für die Beeinflußbarkeit der Sauerstoffbindung durch die Protonenbindung, wird Bohr-Faktor genannt.

Der Bohr-Faktor beträgt bei einem PCO_2 von 40 mmHg für das membrangebundene Hämoglobin 0,34 und für frei gelöstes Hämoglobin 0,39. Protonen beeinflussen also membrangebundenes Hämoglobin in geringerem Maße als freies Hämoglobin. Der Halbsättigungsdruck ist für membrangebundenes Hämoglobin höher als für freies Hämoglobin (1,7 mmHg bei $\text{pH} = 7,2$). Durch die Membranbindung wird also die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins erniedrigt (vgl. Kapitel III.2). Unter annähernd physiologischen Bedingungen ($\text{PCO}_2 = 40$ mmHg, $\text{pH} = 7,2$) führt die Membranbindung dazu, daß sowohl die Sauerstoffbindung (ersichtlich am höheren Halbsättigungsdruck) als auch die sauerstoffabhängige Protonenbindung (ersichtlich am niedrigeren Bohr-Faktor) behindert werden.

Eine Erniedrigung des CO_2 -Partialdruckes auf 7 mmHg führt, wie Abb. 10 zeigt, sowohl für membrangebundenes als auch für freies Hämoglobin zu einer deutlich erhöhten Sauerstoffaffinität. Bei $\text{pH} = 7,2$ beträgt diese Linksverschiebung beim membrangebundenen Hämoglobin 7 mmHg, beim freien Hämoglobin 4,5 mmHg. Als ein quantitatives Maß dient der CO_2 -Faktor, der analog dem Bohr-Faktor als ($\Delta \log P_{50} / \Delta \log \text{PCO}_2$) (bei konstantem pH) definiert ist. Es ergibt sich ein CO_2 -Faktor von 0,27 für membrangebundenes gegenüber 0,17 für frei gelöstes Hämoglobin. Das bedeutet, daß im niedrigen PCO_2 -Bereich die O_2 - CO_2 -Wechselwirkung durch die Hämoglobin-Membranbindung verstärkt wird.

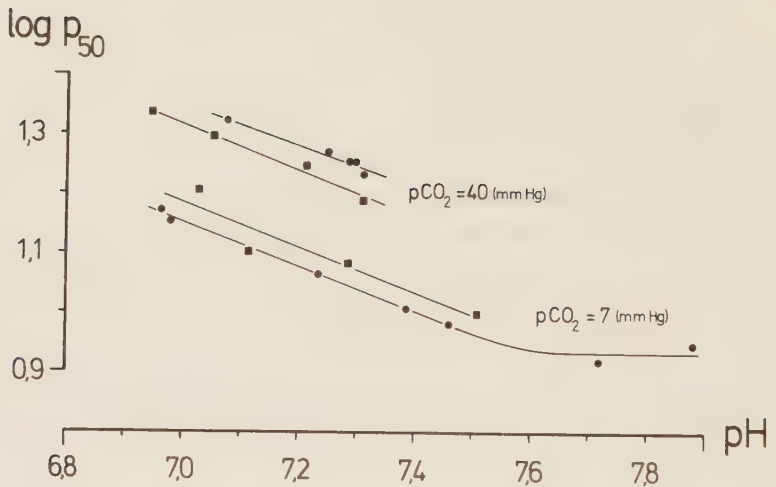


Abb. 10: Halbsättigungsdrucke P_{50} in Abhängigkeit vom pH-Wert.

$PCO_2 = 7$ mmHg; $PCO_2 = 40$ mmHg; Temp. = $37^\circ C$

- membrangebundenes Hämoglobin
- freies Hämoglobin (1g/100 ml)

Der Bohr-Faktor des membrangebundenen Hämoglobins steigt leicht an auf 0,37, der des freien Hämoglobins bleibt etwa konstant bei 0,38. Beide Werte und damit die O_2 -abhängige Protonenbindung sind in Anbetracht der Meßgenauigkeit als gleich zu bezeichnen.

Eine Erhöhung des PCO_2 auf 70 mmHg (Abb. 11) führt zu deutlich verschiedenem Verhalten von membrangebundenem und freiem Hämoglobin.

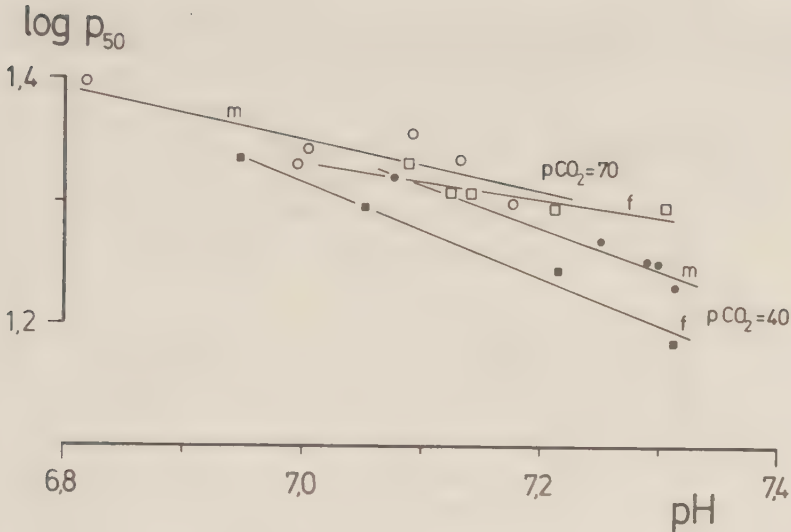


Abb. 11: Halbsättigungsdrucke P_{50} in Abhängigkeit vom pH-Wert (Temp. = 37°C).

- | | |
|-------------------------------------|---------------------|
| ● membrangebundenes Hämoglobin (m) | } $PCO_2 = 40$ mmHg |
| ■ freies Hämoglobin (1g/100 ml) (f) | |
| ○ membrangebundenes Hämoglobin (m) | } $PCO_2 = 70$ mmHg |
| □ freies Hämoglobin (1g/100 ml) (f) | |

Die Sauerstoffaffinität des freien Hämoglobins nimmt merklich ab (bei pH = 7,2 eine Zunahme des P_{50} um 2,8 mmHg); der Bohr-Faktor sinkt von 0,39 auf 0,14. Dies ist dem Verhalten des Vollblutes vergleichbar, bei dem ein erhöhter CO_2 -Partialdruck ebenfalls den Bohr-Effekt vermindert (KILMARTIN and ROSSI-BERNARDI, 1973). Das membrangebundene Hämoglobin wird durch die gleiche PCO_2 -Erhöhung wesentlich weniger beeinflusst. Der Halbsättigungsdruck steigt bei pH = 7,2 nur um 1,35 mmHg; die Änderung des Bohr-Faktors ist ebenfalls geringer (Abfall von 0,34 auf 0,21). Im ho-

hen PCO_2 -Bereich wird die O_2 - CO_2 -Wechselwirkung durch die Membranbindung vermindert.

Abbildung 12 veranschaulicht, wie die Halbsättigungsdrucke vom CO_2 -Partialdruck abhängen.

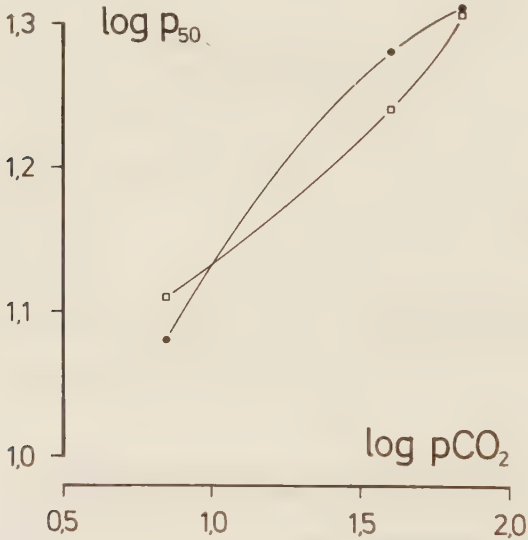


Abb. 12: Abhängigkeit der Halbsättigungsdrucke P_{50} vom CO_2 -Partialdruck bei pH = 7,20

- membrangebundenes Hämoglobin; pH = 7,20
- freies Hämoglobin (1g/100 ml); pH = 7,20

Die Membranbindung ändert die Beeinflußbarkeit der P_{50} durch den CO_2 -Partialdruck, d.h. die O_2 -abhängige CO_2 -Bindung grundlegend; die Effekte sind stark abhängig vom pH-Wert und hier für pH = 7,20 aufgetragen.

b) Einfluß von 2,3-Diphosphoglycerat

Es ist seit längerem bekannt, daß geringe Konzentrationen von 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) einen starken Einfluß auf die Sauerstoffbindungskurve ausüben (BENESCH and BENESCH, 1967; CHANUTIN and CURNISH, 1967). Besonders deutlich äußert sich dieser Einfluß in einer Rechtsverschiebung der Bindungskurve. Da 2,3-DPG und Hämoglobin unter physiologischen Bedingungen etwa in äquimolaren Konzentrationen vorliegen, spielt das 2,3-DPG für die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins und damit für die Sauerstoffversorgung der Gewebe eine bedeutende Rolle.

2,3-DPG bewirkt diese Rechtsverlagerung, indem es sich an das Hämoglobin anlagert und die Sauerstoffaffinität durch Änderung der Konformation erniedrigt; und zwar bindet sich ein Molekül 2,3-DPG an ein Tetramer Hämoglobin (BENESCH et al., 1968). Die Bindungsstelle für 2,3-DPG liegt in der "inneren Kavität" des Hämoglobinmoleküls; an der Bindung maßgeblich beteiligt sind Valin 1 β , Histidin 2 β und Histidin 143 β der beiden β -Ketten (KILMARTIN and ROSSI-BERNARDI, 1973).

Der Einfluß von 2,3-DPG auf den Halbsättigungsdruck bei physiologischen CO₂-Partialdrucken von 40 mmHg ist aus Abb. 13 zu entnehmen (2,3-DPG-Konzentrationen: 0,43 mmol/l und 5 mmol/l). Beim frei gelösten Hämoglobin bewirkt eine 2,3-DPG-Konzentration von 0,43 mmol/l eine Rechtsverschiebung von 1,5 mmHg; bei 5 mmol/l 2,3-DPG beträgt die Rechtsverschiebung 9,1 mmHg. Die Rechtsverschiebung bei 0,43 mmol/l 2,3-DPG ist relativ gering, weil ein großer Teil des 2,3-DPG mit Magnesiumionen, die in einer Konzentration von 4,6 mmol/l vorliegen, eine komplexe Bindung eingeht (COLLIER and LAM, 1970).

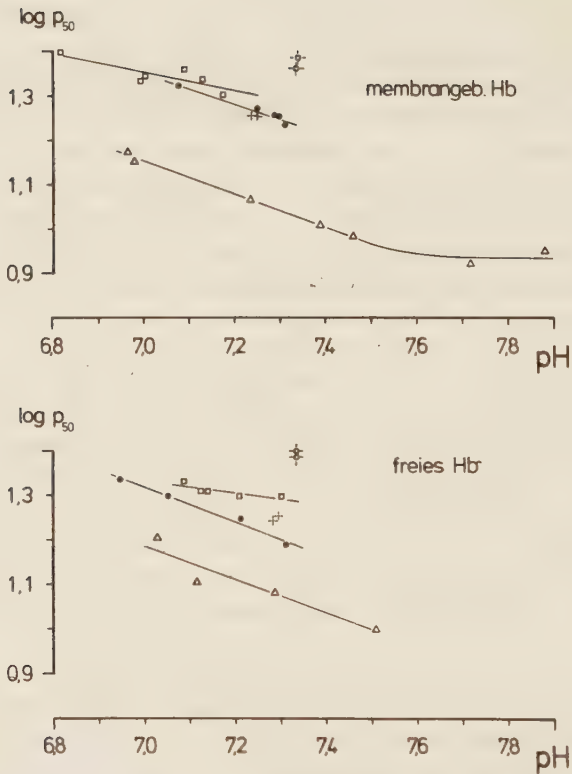


Abb. 13: Übersicht: Halbsättigungsdrucke P_{50} des membran- gebundenen und des freien Hämoglobins in Abhän- gigkeit vom pH-Wert (Temp. = 37°C).
 Δ $PCO_2 = 7$ mmHg; $\bullet$ $PCO_2 = 40$ mmHg; $\square$ $PCO_2 = 70$ mmHg
 $\dashv$ 2,3-DPG = 0,43 mmol/l; $PCO_2 = 40$ mmHg
 $\dagger$ 2,3-DPG = 5 mmol/l; $PCO_2 = 40$ mmHg
 Konzentration des freien Hämoglobins: 1g/100 ml

Der Halbsättigungsdruck des membrangebundenen Hämoglobins wird durch 2,3-DPG deutlich geringer beeinflusst. Bei einer 2,3-DPG-Konzentration von 0,43 mmol/l liegen die Meßpunkte innerhalb des Streubereichs der Bohr-Geraden, die an DPG-freien Hämoglobinproben gemessen wurde; es ist also kein Effekt festzustellen. Bei einer 2,3-DPG-Konzentration von 5 mmol/l beträgt die Rechtsverschiebung 6,3 mmHg im Vergleich zu 9,1 mmHg bei freiem Hämoglobin.

c) Zusammenfassung

Abbildung 13 zeigt nochmals alle Effekte auf einen Blick. Die Bindungskurve des frei gelösten Hämoglobins wird durch CO_2 nach rechts verschoben, der Bohr-Faktor fällt bei hohen CO_2 -Partialdrucken ab. 2,3-DPG bewirkt eine starke Rechtsverschiebung.

Die O_2 -Bindungskurve des membrangebundenen Hämoglobins hingegen wird im Bereich $\text{PCO}_2 > 40$ mmHg von CO_2 in deutlich geringerem Maße beeinflusst, was sich in einer geringeren Rechtsverschiebung und in einem geringeren Abfall des Bohr-Faktors ausdrückt. Ebenso erzeugt 2,3-DPG nicht mehr eine so starke Rechtsverschiebung.

Man kann daraus schließen, daß die Bindung des Hämoglobins an die Erythrozytenmembran sowohl die Hb- CO_2 -Bindung (PCO_2 zwischen 40 und 70 mmHg) als auch die Hb-DPG-Bindung behindert. Dies ließe sich wie folgt erklären: Die Hämoglobin-Membranbindung verändert wie alle anderen Hämoglobin-Effektor-Bindungen die Konformation des Hämoglobinmoleküls. Bei der Konformationsänderung durch die Membranbindung ist wahrscheinlich auch die "innere Kavität" des Hämoglobin-Tetramers in ihrer räumlichen Struktur und damit in ihren Eigenschaften verändert; denn die "innere Kavität" enthält die beiden Valine 1 β , also diejenigen Aminosäuren, die sowohl an der CO_2 -Bindung als auch an der 2,3-Diphosphoglycerat-Bindung beteiligt sind.

4. Gradientenanalyse

Der Halbsättigungsdruck (P_{50}) ist zwar ein wichtiger Kennwert der Sauerstoffbindungskurve, zu einer genauen Analyse der O_2 -Hb-Reaktion ist er jedoch nicht ausreichend, da es sich nur um eine Mittelwertanalyse handelt. Es ist vielmehr notwendig, eine Betrachtung der Partialdrucke und ihrer Änderungen durch Effektoren über den gesamten Sättigungsbereich anzustellen. Damit kann man Aussagen machen, wie die Effektoren auf jeder Stufe der O_2 -Anlagerung wirken. Der Bohr-Faktor und CO_2 -Faktor werden analog dem Vorbild des Halbsättigungsdruckes für die übrigen "Sättigungsdrucke" z.B. P_{10} , P_{20} , P_{30} , ... bestimmt. Dieses Vorgehen ist sinnvoll, da es sich immer wieder erweist, daß die Einflüsse von Effektoren (z.B. H^+ , CO_2 , DPG) auf die Sauerstoffbindung beträchtlich vom Grad der Sauerstoffsättigung abhängen (KIRSCHBAUM, 1963; GARBY et al., 1972; TYUMA et al., 1973; MEIER et al., 1974; HLASTALA et al., 1975; TYUMA et al., 1975; TEISSEIRE et al., 1975; HLASTALA et al., 1977; BÖNING et al., 1978; POYART et al., 1978).

Abbildung 14 zeigt eine Auftragung der Bohr-Faktoren von freiem und membrangebundenem Hämoglobin bei einem konstanten CO_2 -Partialdruck von 40 mmHg (Tabelle VI). Man erkennt die starke Abhängigkeit der Bohr-Faktoren von der Sättigung. Eine alleinige Analyse der Bindungskurven bei Halbsättigung wäre unzureichend. Während der Beladung mit Sauerstoff ändert das Hämoglobin seine funktionellen Eigenschaften erheblich, was durch Messung der Bohr-Faktoren deutlich wird. Die Gradientenfunktion des frei gelösten Hämoglobins mit dem nach oben konvexbogigen Verlauf gleicht Gradientenfunktionen anderer Autoren, die unter vergleichbaren Bedingungen (ähnlicher pH-Wert und PCO_2) an Vollblut gemessen wurden (GARBY et al., 1972; BÖNING et al., 1978; POYART et al., 1978). Zudem erkennt man das unterschiedliche Verhalten von freiem und membrangebundenem Hämoglobin. Letzteres hat im unteren und mittleren Sättigungsbereich einen

kleineren Bohr-Faktor. Durch den steilen Anstieg der Kurve wird der Bohr-Faktor oberhalb von $S = 0,7$ jedoch größer als beim freien Hämoglobin.

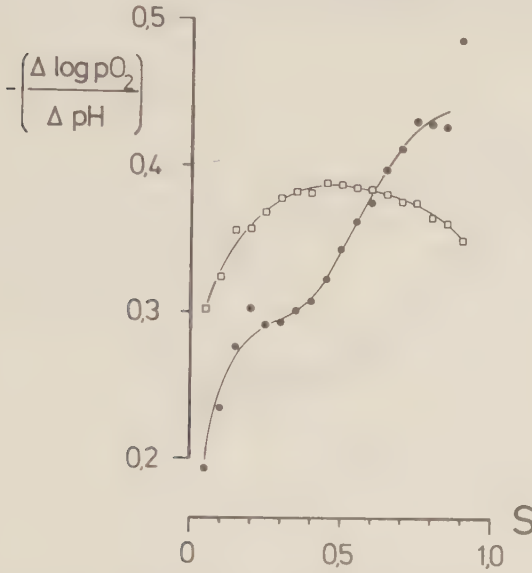


Abb. 14: Bohr-Faktoren in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung S .

$PCO_2 = 40$ mmHg; Temp. = $37^\circ C$

● membrangebundenes Hämoglobin

□ freies Hämoglobin (1g/100 ml)

Der Verlauf der Gradientenfunktion für membrangebundenes Hämoglobin ist folgendermaßen zu interpretieren: Im oberen Sättigungsbereich bewirkt die gleiche Ansäuerung der Probe einen deutlich größeren Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes als im unteren Sättigungsbereich. Unter der Annahme, daß das Hämoglobin stufenweise mit Sauerstoff aufgesättigt wird (siehe Kapitel III.5), bedeutet der steil ansteigende Verlauf, daß die letzten Anlagerungsstufen in ihrer Sauerstoffaffinität stärker durch Protonen beeinflusst werden als die ersten.

Das freie Hämoglobin hingegen zeigt im mittleren Sättigungsbereich ein Maximum der Beeinflußbarkeit durch Protonen.

In Abbildung 15 sind die Bohr-Faktoren bei einem PCO_2 von 7 mmHg aufgetragen (Tabelle VI).

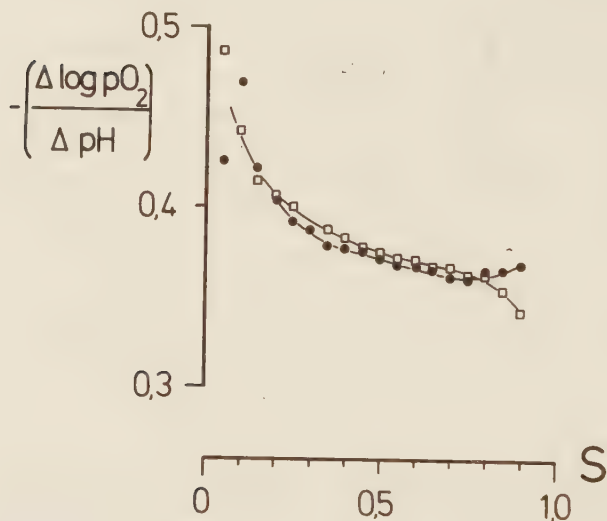


Abb. 15: Bohr-Faktoren in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung S.

$\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$; Temp. = 37°C

● membrangebundenes Hämoglobin

□ freies Hämoglobin (1g/100 ml)

Man sieht, wie sich die Bohr-Faktoren des freien und membrangebundenen Hämoglobins fast über den gesamten Sättigungsbereich gleichen. Im unteren Sättigungsbereich und damit bei den ersten Anlagerungsstufen liegt die größte Beeinflußbarkeit der Sauerstoffbindung durch die Protonenbindung. CO_2 be-

wirkt also eine Differenzierung der O_2 -abhängigen H^+ -Bindung zwischen freiem und membrangebundenem Hämoglobin.

Abbildung 16 zeigt das Verhalten der Bohr-Faktoren bei einem PCO_2 von 70 mmHg (Tabelle VI).

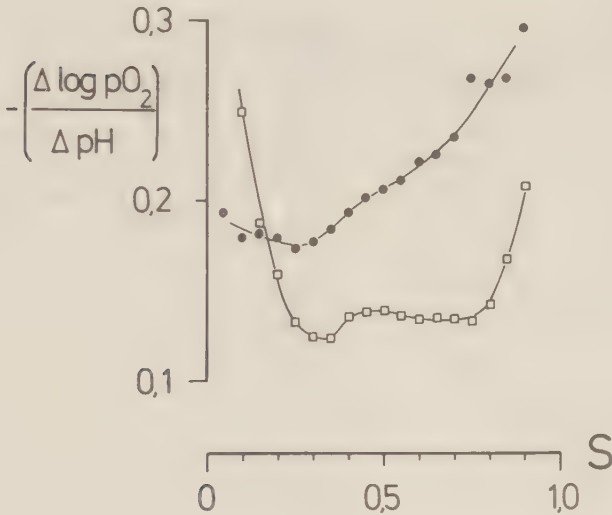


Abb. 16: Bohr-Faktoren in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung S.

$PCO_2 = 70$ mmHg; Temp. = $37^\circ C$

● membrangebundenes Hämoglobin

□ freies Hämoglobin (1g/100 ml)

Beide Gradientenfunktionen zeigen einen nach unten konvexen Verlauf. Die Bohr-Faktoren des membrangebundenen Hämoglobins sind jedoch fast über den gesamten Sättigungsbereich größer als die des freien Hämoglobins. Protonen haben bei einem PCO_2 von 70 mmHg auf die Sauerstoffbindung des membrangebundenen Hämoglobins den größeren Einfluß. In

beiden Fällen steigt die Beeinflußbarkeit der Sauerstoffbindung durch Protonen nach einem anfänglichen Abfall mit zunehmendem Sättigungsgrad an.

Abbildung 17 faßt alle gemessenen Bohr-Faktoren zusammen (Tabelle VI).

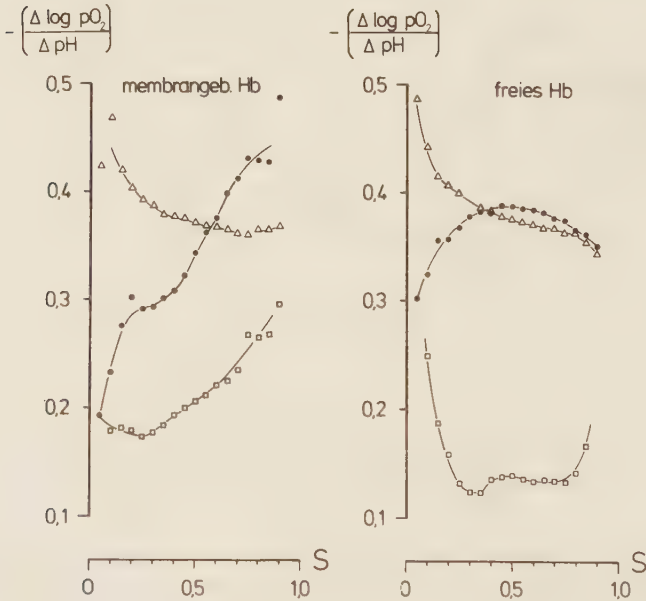


Abb. 17: Übersicht: Bohr-Faktoren des membrangebundenen und des freien Hämoglobins in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung S (Temp. = 37°C).
 Δ PCO₂ = 7 mmHg; ● PCO₂ = 40 mmHg; □ PCO₂ = 70 mmHg
Konzentration des freien Hämoglobins: 1g/100 ml

Die Gradientenfunktionen bei einem PCO₂ = 7 mmHg zeigen einen fast identischen Verlauf. Bei einem PCO₂ = 40 mmHg haben die Kurven eine nach oben konvexe Form. Bei PCO₂ = 70 mmHg ist die Form nach unten konvex.

Man erkennt, daß sich beim freien Hämoglobin die Bohr-Faktoren durch Erhöhung des PCO_2 von 7 mmHg auf 40 mmHg nicht wesentlich ändern. Durch weitere Erhöhung des PCO_2 auf 70 mmHg nehmen die Bohr-Faktoren jedoch stark ab.

Beim membrangebundenen Hämoglobin beginnt diese Abnahme der Bohr-Faktoren durch PCO_2 -Erhöhung schon bei niedrigen CO_2 -Partialdrücken und ist insgesamt geringer.

Auffallend ist die Vielfalt der Formen, die die Gradientenfunktionen annehmen. Von entscheidender Bedeutung für die Form ist offensichtlich der herrschende CO_2 -Partialdruck. So wird der Einfluß deutlich, den die Carbamino-gruppen auf die Interaktion zwischen Protonen-und Sauerstoffbindung ausüben.

In der Literatur finden sich ebenfalls mit wechselnden Versuchsbedingungen sehr verschiedene Kurvenformen (KIRSCHBAUM, 1963; GARBY et al., 1972; TYUMA et al., 1973; MEIER et al., 1974; HLASTALA et al., 1975; TYUMA et al., 1975; TEISSEIRE et al., 1975; HLASTALA et al., 1977; BÖNING et al., 1978; POYART et al., 1978). Allerdings sind bei einigen Autoren die Kurvenformen von der Variation des CO_2 -Partialdruckes weitgehend unabhängig (GARBY et al., 1972; TEISSEIRE et al., 1975). Der CO_2 -Partialdruck war in diesen Versuchsreihen größer als 20 mmHg. Wurde der PCO_2 auf 0 mmHg gesenkt (TYUMA et al., 1973; TYUMA et al., 1975), so nahmen die Gradientenfunktionen eine Form an, die den Formen der Kurve in Abb. 15 ($\text{PCO}_2 = 7$ mmHg) entsprach. Leider finden sich in diesen Arbeiten keine Gradientenfunktionen bei höherem CO_2 -Partialdruck.

Ein zweiter wichtiger Effektor der Sauerstoffbindung ist neben den Protonen das Kohlendioxid. Nach WYMAN's Gleichungen der wechselseitigen Ligandenwirkung ergibt sich:

$$\left(\frac{\partial \log \text{PO}_2}{\partial \log \text{PCO}_2} \right)_{\text{SO}_2, \text{H}^+} = - \left(\frac{\partial \text{SCO}_2}{\partial \text{SO}_2} \right)_{\text{PCO}_2, \text{H}^+}$$

SO_2 = Sauerstoffsättigung; SCO_2 = sauerstoffabhängige CO_2 -Sättigung (CO_2 , gebunden in Form des Carbamino-Hämoglobins)

Bei einem konstanten pH ist die Änderung des Sauerstoffpartialdruckes durch Änderung des Kohlendioxidpartialdruckes (Partialdrucke immer logarithmiert) gleich der Änderung der sauerstoffabhängigen CO_2 -Sättigung pro Änderung der Sauerstoffsättigung. Der CO_2 -Faktor gibt also an, um wieviel der Sauerstoffpartialdruck einer Blutprobe bei konstantem pH durch eine bestimmte Erhöhung des CO_2 -Partialdruckes ansteigt. Gleichzeitig ist der CO_2 -Faktor molekular interpretierbar als Zunahme der Carbaminogruppen durch Abdissoziieren von Sauerstoffmolekülen vom Häm.

Zur Berechnung der CO_2 -Faktoren werden mit Hilfe der Bohr-Geraden die $\log \text{PO}_2$ für einen festen pH berechnet und durch die Differenz der $\log \text{PCO}_2$ ($\log 70 - \log 40$ bzw. $\log 40 - \log 7$) dividiert. Abb. 18 zeigt die erhaltenen Gradientenfunktionen bei einem pH von 7,20 (Tabelle VII).

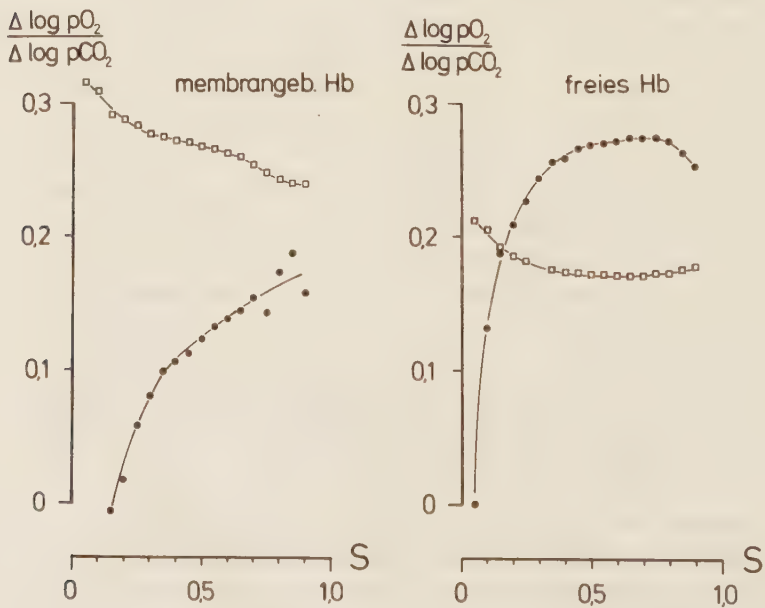


Abb. 18: CO_2 -Faktoren des membrangebundenen und des freien Hämoglobins in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung S bei einem pH-Wert von 7,20 (Temp. = 37°C).
 $\square$ mittlerer PCO_2 = 23,5 mmHg; $\bullet$ mittlerer PCO_2 = 55 mmHg;
 Konzentration des freien Hämoglobins: 1 g/100 ml.

Die Formen der Kurven sind vom mittleren PCO_2 stark abhängig (vgl. Verhältnisse bei Bohr-Faktoren). Im niedrigen PCO_2 -Bereich ist der Verlauf von niedrigen zu hohen Sauerstoffsättigungen leicht abfallend. Das heißt, daß die durch die Sauerstoffbindung bewirkte Abnahme der Carbaminogruppen bei den ersten Sauerstoffanlagerungsstufen größer als bei den letzten ist. Im oberen PCO_2 -Bereich herrschen umgekehrte Verhältnisse.

Ferner ist zu erkennen, daß die CO_2 -Faktoren für das membran-gebundene Hämoglobin im hohen PCO_2 -Bereich kleiner als im niedrigen sind. Daraus folgt, daß die wechselseitige Einflußnahme von Hb-CO_2 -Bindung und Hb-O_2 -Bindung bei hohen CO_2 -Partialdrücken geringer ist. Frei gelöstes Hämoglobin verhält sich in umgekehrter Weise.

Im hohen PCO_2 -Bereich sind die CO_2 -Faktoren des membrangebundenen Hämoglobins deutlich geringer als die des gelösten Hämoglobins. Das heißt, daß die Beeinflussbarkeit der Sauerstoffbindung durch die Carbaminsäurebindung beim membrangebundenen Hämoglobin geringer ist. Im unteren PCO_2 -Bereich herrschen umgekehrte Verhältnisse.

Abbildung 19 zeigt die Auftragung von $(\Delta \text{SO}_2 / \Delta \log \text{H}^+)_{\text{PO}_2 = \text{const.}}$ bei verschiedenen PO_2 -Werten für membrangebundenes und frei gelöstes Hämoglobin (Tabelle VIII). Nach WYMAN gilt:

$$\left(\frac{\partial \text{SO}_2}{\partial \log \text{H}^+} \right)_{\text{PO}_2} = \left(\frac{\partial \text{S}_{\text{H}^+}}{\partial \log \text{PO}_2} \right)_{\text{H}^+}$$

Die Integralfunktion

$$F(\log \text{PO}_2) = \int_{-\infty}^{\log \text{PO}_2} \left(\frac{\partial \text{SO}_2}{\partial \log \text{H}^+} \right) \partial \log \text{PO}_2$$

ist dann die durch die Sauerstoffbindung bewirkte Protonendissoziationskurve bei konstantem pH.

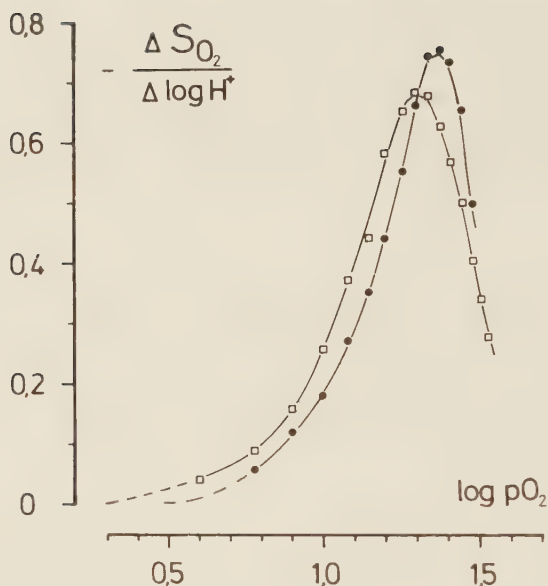


Abb. 19: Gradient ($\Delta SO_2 / \Delta \log H^+$)_{PO₂} in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck

PCO₂ = 40 mmHg; Temp. = 37°C

● membrangebundenes Hämoglobin

□ freies Hämoglobin (1g/100 ml)

Die Konstanz des pH-Wertes während der Messung einer Sauerstoffbindungskurve ist bei den benützten Hämoglobinkonzentrationen experimentell gesichert (vgl. Kapitel II.7). Die Glockenform der Gradientenfunktion, die sowohl bei freiem als auch bei membrangebundenem Hämoglobin gemessen wird, bedeutet, daß die Integralfunktion, d.h. die Protonendissoziationskurve, in beiden Fällen eine sigmoide Form besitzt.

In Abb. 20 sind die Integralfunktionen, d.h. die sauerstoffabhängigen Protonendissoziationskurven, dargestellt.

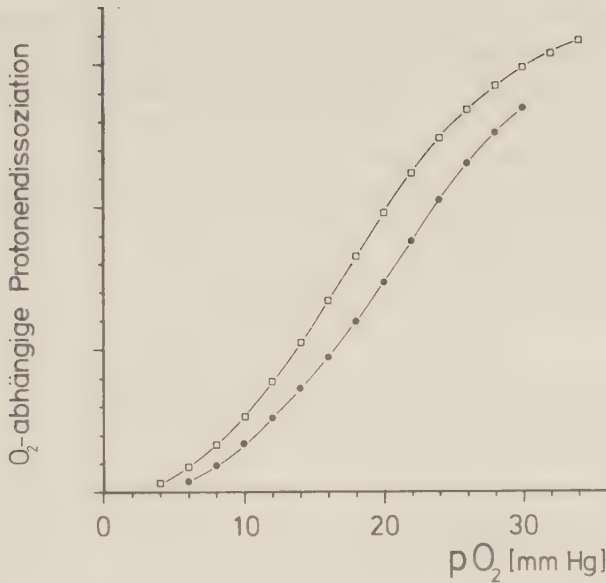


Abb. 20: Sauerstoffabhängige Protonendissoziation

PCO₂ = 40 mmHg; Temp. = 37°C

- membrangebundenes Hämoglobin
- freies Hämoglobin (1g/100 ml)

Es handelt sich um eine sogen. heterologe Bindungskurve, hier z.B. um die Bindung von H-Ionen in Abhängigkeit vom O₂-Partialdruck. Da sowohl für hohe als auch für niedrige Sauerstoffpartialdrucke keine Meßpunkte vorliegen, kann man keinen Anfangspunkt und kein Endplateau der Dissoziationskurven und damit auch keinen Halbsättigungsdruck angeben. Aus dem gleichen Grund hat die Ordinate eine unbestimmte Skalierung, die mit der Sättigung in linearem Zusammenhang steht. Die Abhängigkeit demonstriert jedoch den sigmoiden Verlauf der Protonendissoziation.

Die maximale Steigung der sauerstoffabhängigen Protonendissoziationskurve ist bei linearer Auftragung des PO_2 auf der Abszisse für das membrangebundene Hämoglobin etwas kleiner als für das freie Hämoglobin. Die Protonendissoziationskurve des freien Hämoglobins ist im Vergleich zu der des membrangebundenen Hämoglobins zu niedrigeren Sauerstoffpartialdrücken verschoben; dies ist verständlich, denn gleiches gilt für die Halbsättigungsdrücke (vgl. Abb.6).

Die sauerstoffabhängige CO_2 -Bindung wird mit den reziproken Beziehungen beschrieben:

$$\left(\frac{\partial \text{SO}_2}{\partial \log \text{PCO}_2} \right)_{\text{PO}_2, \text{H}^+, \text{DPG}} = \left(\frac{\partial \text{SCO}_2}{\partial \log \text{PO}_2} \right)_{\text{PCO}_2, \text{H}^+, \text{DPG}}$$

In Abb. 21 sind die Gradienten für membrangebundenes und freies Hämoglobin aufgetragen.

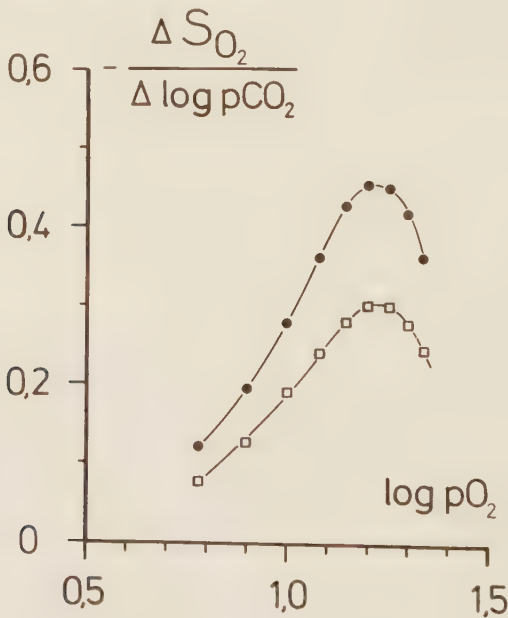


Abb. 21: Gradient $(\Delta \text{SO}_2 / \Delta \log \text{PCO}_2)_{\text{PO}_2}$ in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck
 $\text{pH} = 7,20$; mittlerer $\text{PCO}_2 = 23,5 \text{ mmHg}$; Temp. = 37°C
 ● membrangebundenes Hämoglobin
 □ freies Hämoglobin (1g/100 ml)

Die Änderung des PCO_2 beträgt $40-7 = 33 \text{ mmHg}$; der pH-Wert ist 7,20. Dies führt bei konstantem PO_2 zu einer Sättigungsänderung bis zu ca. 30%. Die reziproken Beziehungen beschreiben jedoch differentielle Änderungen von PCO_2 und SO_2 . Der erhaltene Meßwert ($\Delta \text{SO}_2 / \Delta \log \text{PCO}_2$) stellt also einen Mittelwert über einen relativ großen Meßbereich dar. Man erhält glockenförmige Kurven. Die Maxima und damit die Bereiche der größten CO_2 -Dissoziation liegen für membran-gebundenes und freies Hämoglobin bei gleichem $\log \text{PO}_2$; der Gradient für membrangebundenes Hämoglobin und damit die Steigung der Dissoziationskurve ist größer. Die Integralfunktion ergibt die sauerstoffabhängige CO_2 -Dissoziationskurve und hat ähnlich der sauerstoffabhängigen Protonendissoziationskurve sigmoide Form.

Aus den sigmoiden Formen der sauerstoffabhängigen CO_2 - und Protonendissoziationskurven lassen sich keine positiv kooperativen Wechselwirkungen zwischen den CO_2 - und H^+ -Bindungsstellen ableiten, da die Sauerstoffbindungskurve sigmoid ist. Wenn die Anlagerung von 1 Molekül O_2 zur Abspaltung von z.B. 0,5 Molekülen H^+ bzw. CO_2 führt, ergibt sich auf Grund der sigmoiden Sauerstoffbindungskurve eine sigmoide Form der sauerstoffabhängigen H^+ - bzw. CO_2 -Dissoziationskurve.

5. Die $n(S)$ -Funktion und die $\Delta n(S)$ -Funktion

a) Die $n(S)$ -Funktion

Um genauere Informationen über die Eigenschaften der Sauerstoff-Hämoglobin-Bindung zu erhalten, muß man die Sauerstoffbindungskurve einer Formanalyse unterwerfen. Es ist von Vorteil, dies mittels der Hill-Auftragung der Sauerstoffbindungskurve zu tun. Bei der Sauerstoffbindungskurve wird die Sättigung in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck aufgetragen; bei der Hill-Auftragung ist $\log(S/(1-S))$ die abhängige Variable und $\log PO_2$ die unabhängige. Die Steigung der Hill-Kurve $\partial \log(S/(1-S)) / \partial \log PO_2$ wird n genannt. Der Hill'sche Parameter n ist ein Maß für die Kooperativität zwischen den sauerstoffbindenden Gruppen und damit eine molekular interpretierbare Größe (ANTONINI and BRUNORI, S.164 ff., 1971).

Bei einer monomolekularen Anlagerung, wie sie im Falle des Myoglobins vorliegt, ist n über den gesamten Sättigungsbereich gleich 1. Das Gleiche gilt, wenn das Akzeptormolekül mehrere unabhängige Bindungsstellen besitzt, die alle mit der gleichen Affinität binden. Hat das Akzeptormolekül jedoch mehrere Bindungsstellen mit positiv kooperativen Interaktionen, dann wird n größer als 1. Positive Kooperativität bedeutet, daß die Anlagerung des ersten Substratmoleküls die Affinität der zweiten Bindungsstelle erhöht, und so fort. Die positive Kooperativität bewirkt die sigmoide Form der Sauerstoffbindungskurve. Liegt positive Kooperativität vor, so kann n höchstens den Wert annehmen, der der Anzahl der positiv kooperativen Bindungsstellen entspricht. Für ein tetrameres Molekül wie das Hämoglobin bleibt n kleiner oder gleich 4.

Besitzt das Akzeptormolekül mehrere nicht kooperative Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität, so wird n kleiner als 1. n wird ebenfalls kleiner als 1, wenn negative Kooperativität vorliegt, d.h. wenn die erste Anlagerung die Affinität der zweiten Bindungsstelle vermindert.

Mit Hilfe des Hill'schen Parameters kann man also Aussagen machen über die homologen Wechselwirkungen und Interaktionen der sauerstoffbindenden Hämgruppen. Die Gradientenfunktionen hingegen geben Aufschluß über die heterologen Wechselwirkungen zwischen Sauerstoffbindungsstellen und Effektorbindungsstellen für H^+ , CO_2 , DPG etc.

Bis jetzt war es in der Literatur üblich, für n einen gemittelten Wert anzugeben oder n bei der Halbsättigung zu bestimmen. BARNIKOL analysierte als erster n entlang des gesamten Sättigungsbereiches (BARNIKOL und BURKHARD, 1978). Man erhält so eine Kurve für n in Abhängigkeit von der Sauerstoffsättigung, die sogenannte $n(S)$ -Funktion.

Zahllose Bindungskurven der Arbeitsgruppe BARNIKOL, gemessen mit der spektrometrischen Mikromethode ergeben ausnahmslos den gleichen Typ der $n(S)$ -Funktion: Bei sehr geringen Sättigungen liegen die Werte von n nahe bei 1, um mit zunehmender Sättigung anzusteigen. Bei einer Sättigung von etwa 80 - 85% erreicht n seine größten Werte und fällt dann steil ab. Außer dem Hauptmaximum bei $S = 85\%$ zeigt die $n(S)$ -Funktion noch 1 bis 2 Nebenmaxima. Eine Analyse der Meßergebnisse anderer Arbeitsgruppen ergibt einen ganz ähnlichen Verlauf der $n(S)$ -Funktion. Besonders zu erwähnen ist die Standardbindungskurve von SEVERINGHAUS (1966), welcher die Meßergebnisse vieler Arbeitsgruppen gesammelt und sie zu einer gemittelten Bindungskurve zusammengestellt hat. Die $n(S)$ -Funktion, die BARNIKOL aus den Werten der Severinghaus-Bindungskurve berechnet hat, besitzt ebenfalls die typische asymmetrische Form mit einem Hauptmaximum bei $S = 85\%$ und einem Nebenmaximum (BARNIKOL und BURKHARD, 1978). Hervorzuheben ist, daß die der Severinghaus-Kurve zugrundeliegenden Bindungskurven nicht spektrometrisch sondern gasometrisch nach der Van Slyke-Methode gemessen wurden; die typische Form der $n(S)$ -Funktion wird also mit zwei unabhängigen Verfahren gefunden.

Die relativen Maxima in der $n(S)$ -Funktion bedeuten Welligkeiten in der Sauerstoffbindungskurve. Eine mit Hilfe des Adair'schen Modelles optimal angepaßte Bindungskurve zeigt diese Welligkeiten nicht. Die Unterschiede betragen ca. 1 Sättigungsprozent (ROUGHTON and SEVERINGHAUS, 1973). BARNIKOL nennt dieses Verhalten die Feinstruktur der Sauerstoffbindungskurve (BARNIKOL und BURKHARD, 1978).

b) Versuch einer Interpretation der $n(S)$ -Funktion

Bei $S = 0\%$ und $S = 100\%$ nimmt n den Wert 1 an. Denn sowohl die Besetzung der ersten als auch der letzten Bindungsstelle mit Sauerstoff stellt eine einfache, monomolekulare Anlagerung dar (BARNIKOL und BURKHARD, 1978), auch wenn die Bindungskonstanten der ersten und letzten Anlagerungsstufe unterschiedlich sind; der n -Wert ist in jedem Fall gleich 1.

Auffällig ist die starke Asymmetrie der $n(S)$ -Funktion. Man kann daraus schließen, daß die Zahl der kooperativen O_2 -Hb-Bindungsstellen mit steigender Sättigung zunimmt. Dies ist erfüllt, wenn die Gesamtheit aller Hämoglobinmoleküle simultan stufenweise mit Sauerstoff aufgesättigt werden; d.h., daß die zweite Bindungsstelle erst dann in nennenswertem Umfang mit Sauerstoff besetzt wird, wenn die ersten Bindungsstellen voll gesättigt sind, und so fort. Auf diese Weise existiert erst im oberen Sättigungsbereich die größtmögliche Anzahl von kooperierenden O_2 -Hb-Bindungen, und n erreicht sein absolutes Maximum. Wenn bei relativ niedrigen O_2 -Partialdrucken ein nennenswerter Teil des Hämoglobins als $Hb(O_2)_3$ oder $Hb(O_2)_4$ vorläge, ein anderer Teil aber noch voll desoxygeniert wäre, wenn also das Hämoglobin dazu tendieren würde, mit Sauerstoff durchgeladen zu werden, dann würde sich das absolute Maximum der $n(S)$ -Funktion zu niedrigeren Sättigungen verschieben.

Ein Maximum in der $n(S)$ -Funktion bedeutet in der Hill-Auftragung der Sauerstoffbindungskurve eine Zunahme der Anstiegssteilheit. Das heißt, daß das Hämoglobin in diesem Abschnitt mit steigendem PO_2 leichter aufgesättigt wird.

Ein Maximum der $n(S)$ -Funktion zeigt also den Übergang des Hämoglobins zu einer höheren Affinitätsstufe für Sauerstoff an. Wenn sich 3 Maxima an der $n(S)$ -Funktion unterscheiden lassen, dann liegen 3 Übergänge vor und damit 4 Affinitätsstufen des Hämoglobins für Sauerstoff (BARNIKOL und BURKHARD, 1978; BARNIKOL, 1979).

Das absolute Maximum der $n(S)$ -Funktion gibt Aufschluß über die Anzahl der positiv kooperierenden Bindungsstellen. Für tetrameres Hämoglobin bleibt $n < 4$ (BARNIKOL, 1979).

c) Die $\Delta n(S)$ -Funktion

Der Einfluß eines Effektors (z.B. H^+ , CO_2 , DPG) auf die Sauerstoffbindung läßt sich mit Hilfe eines Gradienten ($\partial \log PO_2 / \partial \log [\text{Effektor}]$) beschreiben. Im allgemeinen ist dieser Gradient stark abhängig von der Sättigung; diese Abhängigkeit wird Gradientenfunktion genannt.

Wäre der Gradient über den gesamten Sättigungsbereich konstant, so würde eine bestimmte Änderung der Effekorkonzentration eine konstante Änderung des $\log PO_2$ bewirken. Für die nach Hill aufgetragene Sauerstoffbindungskurve würde das eine parallele Verschiebung in Richtung der Abszisse bedeuten; ihre Form bliebe unverändert. Da die Gradienten aber nicht konstant sind, erfahren die Sauerstoffbindungskurven durch Konzentrationsänderungen der Effektoren eine Änderung ihrer Form. Mit anderen Worten: Ein Effektor beeinflußt die Feinstruktur der Sauerstoffbindungskurve und damit die $n(S)$ -Funktion. Die Änderung der $n(S)$ -Funktion wird $\Delta n(S)$ -Funktion genannt (BARNIKOL, 1979).

Die Gradientenfunktionen, die von verschiedenen Autoren mit unabhängigen Methoden gemessen werden, bedeuten, daß Sauerstoffbindungskurven in systematischer Art und Weise in ihrer Form verändert werden. Dies ist ein Beweis für die Existenz einer Feinstruktur der Sauerstoffbindungskurve. Die Feinstruktur der Bindungskurve und ihre Änderungen können mit Hilfe von $n(S)$ - und $\Delta n(S)$ -Funktionen dargestellt werden. Die Interpretation der Feinstruktur steht erst am Anfang.

d) Meßergebnisse

Eine $n(S)$ -Funktion wird folgendermaßen berechnet: Aus der Originalregistrierung einer Sauerstoffbindungskurve entnimmt man etwa 20 - 25 Meßpunkte und bestimmt die Sättigung und den Sauerstoffpartialdruck. Nun bildet man $\log(S/(1-S))$ und $\log PO_2$ und erhält so die Punkte der Hill-Auftragung. Jeweils zwei benachbarte Punkte dienen nun dazu, die Steigung der Sekante zu berechnen. Da die Meßpunkte nahe beieinanderliegen, geht man davon aus, daß Sekanten- und Tangentensteigung sich nur unwesentlich voneinander unterscheiden; man hat also n berechnet. Als zugehörige Sättigung benutzt man das arithmetische Mittel der Sättigungen der beiden Meßpunkte. Auf diese Weise erhält man in Abhängigkeit von der Sättigung etwa 20 n -Werte, durch die man graphisch eine Kurve legen kann, die $n(S)$ -Funktion. Wiederholungsmessungen an ein und derselben Probe ergeben, daß die Punkte einer $n(S)$ -Funktion mit einer Standardabweichung von etwa 10% des Mittelwertes streuen, d.h. bei $n = 3$ ist $\sigma \pm 0,3$.

Die Abbildungen 22 bis 27 zeigen die gemessenen $n(S)$ -Funktionen des membrangebundenen und frei gelösten Hämoglobins bei einem PCO_2 von 7, 40 und 70 mmHg. Jedes Bild enthält die $n(S)$ -Funktion bei $pH = 7,0$ und $pH = 7,4$. Auf diese Weise wird ersichtlich wie die $n(S)$ -Funktionen durch Protonen, CO_2 und Membranbindung modifiziert werden (Tabelle X).

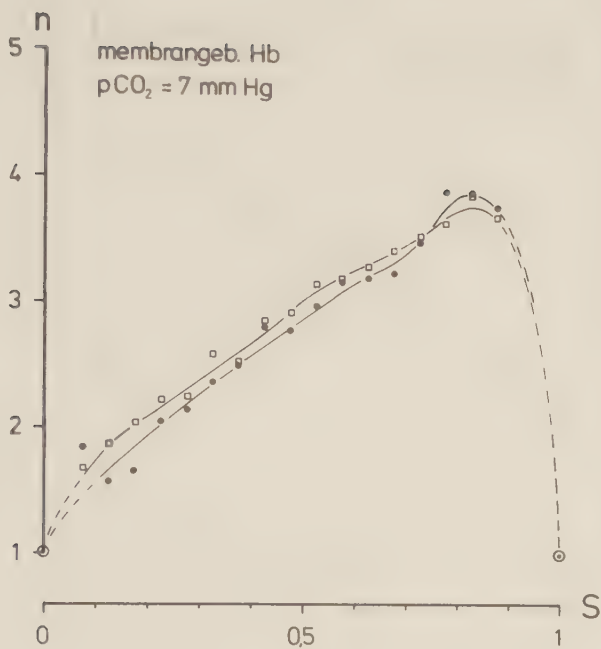


Abb. 22: n(S)-Funktionen
membrangebundenes Hämoglobin
PCO₂ = 7 mmHg; Temp. = 37°C
□ pH = 7,0; ● pH = 7,4

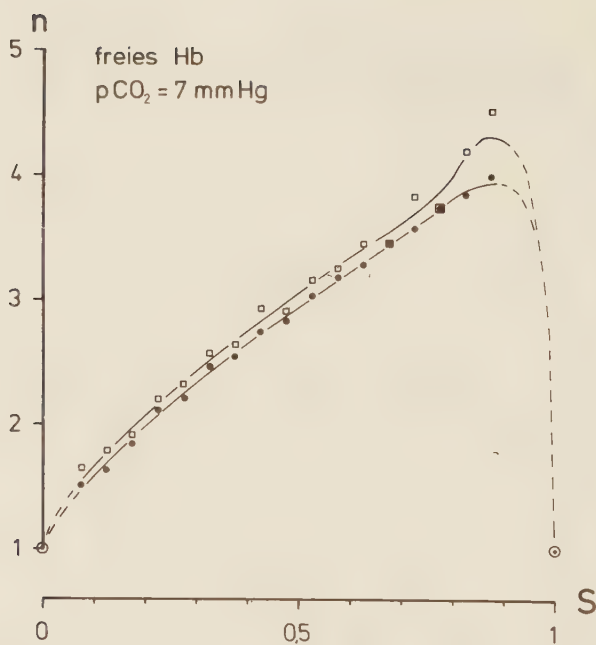


Abb. 23: n(S)-Funktionen
freies Hämoglobin (1g/100 ml)
PCO₂ = 7 mmHg; Temp. = 37°C
□ pH = 7,0; ● pH = 7,4

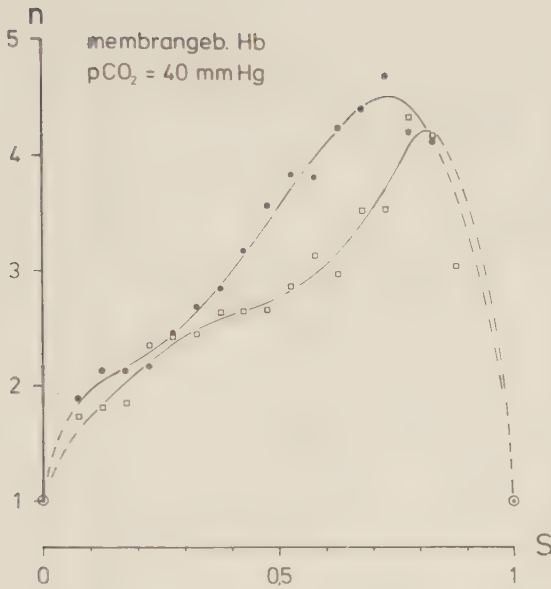


Abb. 24: $n(S)$ -Funktionen
membrangebundenes Hämoglobin
 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; Temp. = 37°C
□ pH = 7,0; ● pH = 7,4

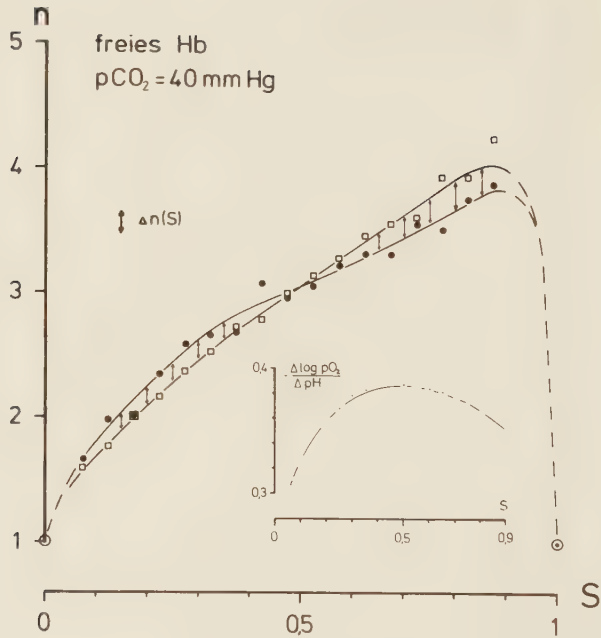


Abb. 25: $n(S)$ -Funktionen und $\Delta n(S)$ -Funktionen
 freies Hämoglobin (1g/100 ml)
 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; Temp. = 37°C
 $\square$ pH = 7,0; $\bullet$ pH = 7,4
 Die Zusatzabbildung enthält die Bohr-
 Faktoren (vgl. Abb. 14), mit deren Hilfe
 sich die $\Delta n(S)$ -Funktion berechnen läßt.

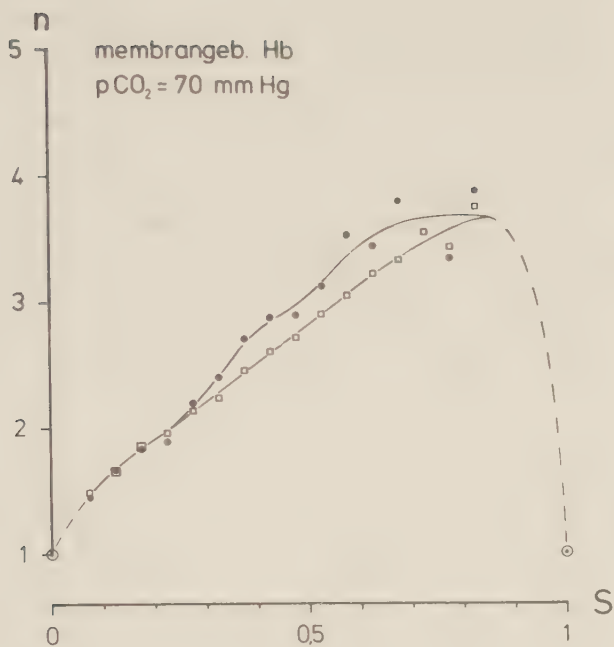


Abb. 26: $n(S)$ -Funktionen
membrangebundenes Hämoglobin
PCO₂ = 70 mmHg; Temp. = 37°C
□ pH = 7,0; ● pH = 7,4

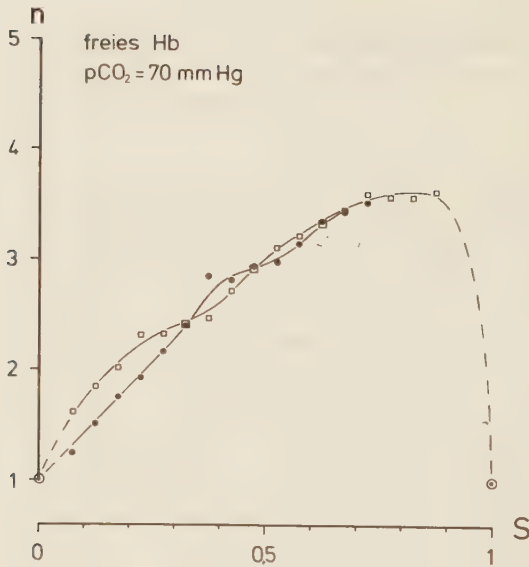


Abb. 27: $n(S)$ -Funktionen
freies Hämoglobin (1g/100 ml)
 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; Temp. = 37°C
 $\square$ pH = 7,0; $\bullet$ pH = 7,4

Zur Berechnung der $n(S)$ -Funktionen werden die Bohr-Geraden bei den Sättigungen 5%, 10%, 15% etc. benutzt; die Sättigungen sind vorgegeben, die $\log \text{PO}_2$ berechnet man aus den Bohr-Geraden für pH = 7,0 und pH = 7,4. Die $n(S)$ -Funktionen von Abb. 22 bis 27 entstammen also nicht direkt, sondern indirekt aus den "Urkurven", sie sind also gemittelte Funktionen.

Der direkte Zusammenhang zwischen der $\Delta n(S)$ -Funktion und einer Gradientenfunktion soll am Beispiel des frei gelösten Hämoglobins bei einem PCO_2 von 40 mmHg demonstriert werden (siehe Abb. 25). Der in seiner Konzentration variierte Effektor ist H^+ . Die Bohr-Faktoren nehmen etwa bis zur Halbsättigung kontinuierlich zu. Das bedeutet in der Hill-Auftragung, daß die Bindungskurve einer sauren Hämoglobinprobe stets flacher verläuft als die Bindungskurve der alkalischen Hämoglobinprobe; $n(S)$ der sauren Probe ist also kleiner als $n(S)$ der alkalischen Hämoglobinprobe. Nach der Halbsättigung nehmen die Bohr-Faktoren kontinuierlich ab. Damit kehren sich die Verhältnisse um. Die Bindungskurve der sauren Probe wird steiler in der Hill-Auftragung, daher wird $n(S)$ größer.

Die übrigen $\Delta n(S)$ -Funktionen können mit den entsprechenden Gradientenfunktionen (Tabelle VI und VII) in analoger Weise abgeleitet werden.

Alle $n(S)$ -Funktionen zeigen den typischen asymmetrischen Verlauf mit dem Hauptmaximum im oberen Sättigungsbereich. Man muß also auch beim membrangebundenen Hämoglobin eine stufenweise Aufsättigung mit Sauerstoff annehmen.

Die maximalen n -Werte sind meist etwas kleiner als 4. Man kann also schließen, daß sowohl frei gelöstes als auch membrangebundenes Hämoglobin bei einem PCO_2 von 7 und 70 mmHg als tetramere Hämoglobine mit 4 positiv kooperativen, sauerstoffbindenden Gruppen vorliegen. Nur membrangebundenes Hämoglobin bei einem PCO_2 von 40 mmHg macht eine Ausnahme, indem es einen maximalen n -Wert von etwa 4,3 erreicht. Dies könnte auf 3 Arten erklärt werden: Erstens, $n > 4$ ist durch Streuung zu erklären (die Standardabweichung der $n(S)$ -Werte beträgt ja etwa 10%) und damit ein zufälliger Fehler. Zweitens, die zugrundeliegenden Bindungskurven wurden fehlerhaft gemessen. Drittens, $n > 4$ ist die Wahrheit. Dann müßte man schließen, daß mehr als 4 positiv kooperative Gruppen

beieinanderliegen. Dies wäre verwirklicht, wenn zwei oder mehr Hämoglobintetramere assoziieren und ihre sauerstoffbindenden Gruppen in positiv kooperative Wechselwirkung träten. Die Membran könnte diese Bedingungen schaffen, denn sie häuft, indem sie Hämoglobin fest bindet, eine relativ große Menge Hämoglobin auf relativ kleinem Raum an. Diese "lokale Konzentrationserhöhung" des Hämoglobins könnte zu intertetrameren Wechselwirkungen führen.

Bei einem PCO_2 von 7 oder 70 mmHg sind die $n(\text{S})$ -Funktionen des membrangebundenen Hämoglobins immer kleiner als 4. Daraus wäre zu folgern, daß die intertetrameren Wechselwirkungen bei physiologischen CO_2 -Partialdrücken begünstigt werden.

Nebenmaxima sind in den vorliegenden Kurven nur andeutungsweise ausgebildet und nicht konstant nachweisbar. Eine Interpretation dieses Verhaltens ist beim jetzigen Erkenntnisstand nicht möglich. Zu diskutieren wäre die Bildung von unterschiedlichen Hämoglobinpopulationen ($\text{Hb} - \text{H}^+$, $\text{Hb} - \text{CO}_2$, etc.). Jede Population besäße eine ihr eigene Sauerstoffbindungskurve mit zugehöriger $n(\text{S})$ -Funktion und deutlich ausgeprägten Nebenmaxima. Es wäre anzunehmen, daß die Lage der Nebenmaxima von Population zu Population verschieden ist. Auf der gemessenen $n(\text{S})$ -Funktion, die eine Mittelung aller populationsspezifischen $n(\text{S})$ -Funktionen darstellt, müßten sich die Nebenmaxima gegenseitig verschmieren und wären nicht mehr sichtbar.

IV. Zusammenfassung

Es ist bekannt, daß das Hämoglobin im Erythrozyten nicht nur in frei gelöster Form vorliegt, sondern daß auch ein Teil an der Innenfläche der Erythrozytenmembran reversibel gebunden wird ($1,2 \times 10^6$ Bindungsstellen pro Erythrozyt) (SHAKLAI et al., 1977). In dieser Arbeit wird untersucht, ob und wie die sauerstoffbindenden Eigenschaften des Hämoglobins einschließlich deren Beeinflußbarkeit durch die Effektoren (H^+ -Ionen, CO_2 , 2,3-DPG) durch die Membranbindung verändert werden. Zudem kann diese Studie als Modellfall für die Änderung der funktionellen Eigenschaften eines Proteins durch die Bindung an eine biologische Membran dienen; insbesondere wenn man an die Analogie der O_2 -Hb-Bindung mit der Enzym-Substrat-Bindung denkt.

Die von BARNIKOL weiterentwickelte photometrische Mikromethode nach NIESEL und THEWS schafft die Voraussetzungen, Sauerstoffbindungskurven des membrangebundenen Hämoglobins zu messen (BARNIKOL et al., 1978; NIESEL und THEWS, 1961). Membrangebundenes Hämoglobin erhält man, indem man Erythrozyten durch Ausfrieren hämolysiert und die hämoglobinbeladenen Membranen nach Auswaschen des frei gelösten Hämoglobins durch Zentrifugieren gewinnt. Als direkter Vergleich und "Nullversuch" wird die Sauerstoffbindung an frei gelöstem Hämoglobin untersucht. Sowohl in der Membransuspension als auch in der Hämoglobinlösung wird ein gleiches Ionenmilieu eingestellt. Es simuliert die Verhältnisse im Erythrozyten, welcher bei $37^\circ C$ 24 Stunden lang inkubiert wurde. Die O_2 -Bindungskurven werden bei normalem Luftdruck, vollständiger Wasserdampfsättigung und $37^\circ C$ registriert. Die Konzentrationen von H^+ , CO_2 und 2,3-DPG werden variiert, um den Einfluß dieser Effektoren auf die O_2 -Hb-Bindung vergleichend zu untersuchen.

Membrangebundenes Hämoglobin besitzt eine O_2 -Bindungskurve, die der Bindungskurve des frei gelösten Hämoglobins qualitativ gleicht, d.h. S-förmig ist.

Eine Analyse der Halbsättigungsdrucke bei den verschiedenen Versuchsbedingungen läßt die Unterschiede zwischen freiem und membrangebundenem Hämoglobin erkennen.

Durch die Membranbindung wird die O_2 -Affinität verändert; dieser Einfluß ist stark abhängig vom CO_2 -Partialdruck, nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ. Bei niedrigem CO_2 -Partialdruck von 7 mmHg wird die O_2 -Affinität durch die Membranbindung gesteigert, bei PCO_2 von 40 mmHg vermindert und bei PCO_2 von 70 mmHg nicht mehr beeinflusst (pH-Wert jeweils 7,20).

Auch der Bohr-Effekt wird durch die Membranbindung beeinflusst. Bei freiem Hämoglobin führt eine Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks über 40 mmHg zu einer deutlichen Verminderung der H^+ -Abhängigkeit der O_2 -Bindung (erkenntlich an der Abnahme des Bohr-Faktors). Membrangebundenes Hämoglobin dagegen zeigt schon bei einem CO_2 -Partialdruck von 40 mmHg eine Verminderung der H^+ -Abhängigkeit der O_2 -Bindung. Insgesamt ist diese Verminderung deutlich geringer. Durch die Membranbindung wird daher die Wirkung der H^+ -Ionen als Effektor der O_2 -Bindung verändert.

2,3-DPG führt bei freiem Hämoglobin zu einer deutlichen Verminderung der O_2 -Affinität; bei membrangebundenem Hämoglobin ist der Effekt wesentlich geringer (PCO_2 jeweils 40 mmHg).

Die Ergebnisse zeigen, daß die Membranbindung die O_2 -Bindung und ihre Beeinflußbarkeit durch Effektoren wesentlich variiert. Man kann dies durch eine Konformationsänderung erklären, die das Hämoglobinmolekül durch die Membranbindung erfährt. Der genaue molekulare Mechanismus läßt sich aus den Ergebnissen nicht ableiten.

Da die Eigenschaften des Hämoglobins vom Grad der O_2 -Sättigung abhängig sind, ist eine alleinige Analyse der Halbsättigungsdrucke unvollständig. Es wird eine Analyse über den gesamten O_2 -Sättigungsbereich mittels WYMAN's reziproken Beziehungen vorgenommen (sogen. Gradientenanalyse). Die Auf-

tragung der Gradienten gegen die Sättigung ergibt die sogenannten Gradientenfunktionen. So erhält man für jede O_2 -Anlagerungsstufe molekular interpretierbare Parameter, die Aussagen erlauben über die Wechselwirkungen der Liganden O_2 , CO_2 , H^+ und über die Variation dieser Wechselwirkungen durch die Membranbindung. Die Aussagen, die man über die H^+ - O_2 -Wechselwirkung und CO_2 - O_2 -Wechselwirkung mit Hilfe der Analyse der Halbsättigungsdrucke machen kann, sind in der Gradientenanalyse als Sonderfall enthalten.

Die Gradientenanalyse zeigt: Die Gradienten sind deutlich abhängig von der O_2 -Sättigung. Durch Änderung des CO_2 -Partialdruckes werden Form und Lage der Gradientenfunktionen und der Einfluß der Membranbindung auf die Gradientenfunktionen erheblich variiert. Somit wird durch die Membranbindung die Empfindlichkeit der O_2 -Bindung gegen die Effekteure über den gesamten Sättigungsbereich modifiziert.

Eine Erhöhung der O_2 -Sättigung durch Erhöhen des O_2 -Partialdruckes führt gleichzeitig zu einem Abdissoziieren von H^+ -Ionen und CO_2 vom Hämoglobinmolekül. Man nennt dies die O_2 -abhängige H^+ -Dissoziation bzw. CO_2 -Dissoziation. Mit Hilfe der "reziproken Beziehungen" nach WYMAN lassen sich aus den gemessenen O_2 -Bindungskurven Gradientenfunktionen ermitteln, die die ersten Ableitungen der O_2 -abhängigen H^+ - bzw. CO_2 -Dissoziationskurven darstellen. Diese Gradientenfunktionen haben einen glockenförmigen Kurvenverlauf. Das Maximum der Gradientenfunktion wird im Falle der O_2 -abhängigen H^+ -Dissoziation durch die Membranbindung größer; außerdem wird es zu höheren O_2 -Partialdrücken verschoben. Im Falle der O_2 -abhängigen CO_2 -Dissoziation wird das Maximum der Gradientenfunktion durch die Membranbindung ebenfalls größer aber nicht verschoben. Die Integralfunktionen der Gradientenfunktionen ergeben die O_2 -abhängigen H^+ - bzw. CO_2 -Dissoziationskurven. Sie sind - das folgt aus dem glockenförmigen Verlauf der Gradientenfunktionen - sowohl für freies als auch für membran-gebundenes Hämoglobin S-förmig.

Die Steigung n der sogenannten Hill-Auftragung der O_2 -Bindungskurve ($\log(S/(1-S))$ gegen $\log PO_2$) gibt Auskunft über die Wechselwirkungen der O_2 -Bindungsstellen des Hämoglobinmoleküls untereinander (sogen. homotrope Wechselwirkungen). Ist $n > 1$, dann liegt positive Kooperativität vor, d.h., die Bindung eines O_2 -Moleküls erhöht die Bindungskonstante der nächsten O_2 -Anlagerungsstufe. Die sigmoide Form der O_2 -Bindungskurve ist die Folge der positiven Kooperativität. Mißt man n über den gesamten O_2 -Sättigungsbereich, erkennt man, daß n in charakteristischer Art und Weise von der O_2 -Sättigung abhängt. Man erhält die sogenannte $n(S)$ -Funktion (BARNIKOL, 1978 und 1979).

Eine Analyse der $n(S)$ -Funktionen und ihrer Änderungen durch Effektoren legt den Schluß nahe, daß sowohl bei freiem als auch bei membrangebundenem Hämoglobin 4 Bindungsstellen für Sauerstoff existieren, die positive Kooperativität zeigen. Bei freiem und membrangebundenem Hämoglobin findet man eine sogenannte Feinstruktur, d.h. feine Welligkeiten in der O_2 -Bindungskurve, die durch die Effektoren H^+ und CO_2 modifiziert werden.

Die $n(S)$ -Funktionen werden durch die Effektoren H^+ und CO_2 und durch die Membranbindung modifiziert. Ein System, nach dem dies geschieht, kann man aus den gemessenen Kurven nicht erkennen.

Am Beispiel von Hämoglobin ist gezeigt, daß durch die Membranbindung die funktionellen Eigenschaften eines Proteins entscheidend modifiziert werden können. Es ist umgekehrt vorstellbar, daß z.B. Enzyme erst durch Membranbindung biologisch voll und richtig funktionsfähig werden.

V. Tabellenanhang

Die gemessenen Transmissionen der Sauerstoffbindungskurven aus Tabelle I bis III betragen 57% im niedrigsten Fall und 90% im höchsten Fall, bezogen auf die Transmission von destilliertem Wasser.

Tabelle I: Sauerstoffbindungskurven des membrangebundenen Hämoglobins. Tabelle I enthält die ursprünglich gemessenen Sauerstoffbindungskurven des membrangebundenen Hämoglobins. Die Temperatur beträgt immer 37°C.

1.1 PCO₂ = 7 mmHg; pH= 6,965

1.2 PCO₂ = 7 mmHg; pH= 6,979

PO ₂ [mmHg]	S [%]	PO ₂ [mmHg]	S [%]
3,716	4,87	2,074	2,27
5,043	7,72	3,670	5,62
6,370	11,69	5,266	9,53
7,698	16,00	6,862	14,88
9,025	21,29	8,457	21,18
10,352	27,00	10,053	28,89
11,679	33,39	10,851	32,60
13,006	40,13	11,649	36,70
14,330	46,99	12,447	40,47
15,660	54,04	13,244	44,99
16,988	60,62	14,042	49,34
18,315	67,06	14,840	53,48
19,642	72,33	15,638	57,81
20,969	77,09	16,436	61,40
22,296	81,08	18,032	68,15
23,623	84,48	19,627	74,35
24,951	87,10	21,223	79,02
27,605	90,95	22,819	83,35
		24,415	86,65
		26,010	89,02
		27,606	91,06

P₅₀ = 14,90 mmHg

P₅₀ = 14,17 mmHg

1.3 $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,235$

1.4 $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,388$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
2,267	4,55	1,994	4,41
3,600	8,91	2,991	7,73
4,933	13,75	3,988	11,67
6,267	19,62	4,985	16,50
7,600	26,32	5,982	21,51
8,933	34,01	6,979	27,40
9,600	38,04	7,976	34,09
10,267	41,77	8,973	40,77
10,933	46,47	9,970	48,70
11,600	49,86	10,967	55,18
12,267	54,39	11,964	62,73
12,933	57,80	12,960	68,56
13,600	61,72	13,957	73,93
14,933	68,35	14,954	78,93
15,600	71,00	15,951	83,20
16,933	76,05	16,948	86,47
18,267	80,75	17,945	88,92
19,600	84,14	18,942	90,73
20,933	86,89		
23,600	91,04		

$\text{P}_{50} = 11,62 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 10,17 \text{ mmHg}$

1.5 $\text{PCO}_2 = 7\text{mmHg}$; $\text{pH} = 7,460$

PO_2 [mmHg]	S [%]
1,247	3,14
2,078	5,58
2,909	8,40
3,740	11,40
4,571	15,09
5,403	19,92
6,234	25,37
7,065	30,70
7,896	36,86
8,727	43,46
9,558	49,75
10,390	56,36
11,221	62,09
12,052	67,18
12,883	71,95
13,714	76,47
14,545	80,34
15,377	83,57
16,208	86,22
17,039	88,22
18,701	91,84

$\text{P}_{50} = 9,59 \text{ mmHg}$

2.1 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,077$

2.2 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,250$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
2,719	2,21	5,265	4,69
4,078	3,53	6,582	7,12
5,437	5,64	7,898	10,14
6,797	8,10	10,531	17,29
8,156	10,82	11,847	21,28
10,875	17,11	13,163	25,89
12,234	20,60	14,480	31,10
13,593	24,94	15,796	37,02
14,953	29,43	17,113	42,98
16,312	33,92	18,429	49,20
17,671	38,73	19,745	55,77
19,031	43,52	21,062	61,17
20,390	48,21	22,378	66,37
21,749	52,71	23,694	71,91
23,109	57,45	25,011	76,48
24,468	62,09	26,327	80,29
25,827	65,87	28,960	86,39
27,186	70,06	31,592	90,25
29,905	77,16		
31,264	80,40		
33,983	85,28		
39,420	90,40		

$\text{P}_{50} = 20,92 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 18,60 \text{ mmHg}$

2.3 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,288$

PO_2 [mmHg]	S [%]	$\log \text{PO}_2$	$\log (\text{S}/(1-\text{S}))$
3,020	2,25	0,4800	-1,639
4,605	4,76	0,6632	-1,301
6,193	7,52	0,7919	-1,090
7,781	10,96	0,8910	-0,910
9,369	15,16	0,9717	-0,748
10,957	20,42	1,0397	-0,591
12,545	26,25	1,0985	-0,449
14,133	32,83	1,1502	-0,311
15,721	39,96	1,1965	-0,177
17,309	47,30	1,2383	-0,047
18,897	54,55	1,2764	0,079
20,485	61,71	1,3114	0,207
22,073	68,45	1,3439	0,336
23,661	74,14	1,3740	0,457
25,249	79,18	1,4022	0,580
26,837	83,19	1,4287	0,695
28,425	86,39	1,4537	0,803
30,013	88,83	1,4773	0,901
31,601	90,44	1,4997	0,976

$\text{P}_{50} = 17,90 \text{ mmHg}$

2.4 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,298$

2.5 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,312$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
2,739	2,54	3,951	3,86
4,109	4,47	5,269	6,51
5,479	7,25	6,586	9,44
6,849	10,73	7,903	13,56
8,218	14,46	9,220	17,63
9,588	18,42	10,537	21,73
10,958	22,48	11,854	26,84
12,327	27,25	13,171	32,06
13,697	32,51	14,488	37,88
15,067	37,71	15,806	43,76
16,437	43,64	17,123	50,28
17,806	49,92	18,440	56,78
19,176	56,29	19,757	63,27
20,546	62,30	21,074	69,31
21,915	67,93	22,391	74,94
23,285	73,09	23,708	79,56
24,655	77,38	25,025	83,22
26,025	80,54	26,343	86,59
28,764	85,42	28,977	91,59
32,873	90,32		

$\text{P}_{50} = 17,82 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 17,07 \text{ mmHg}$

3.1 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 6,818$

3.2 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 6,995$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
4,536	3,97	2,367	2,63
8,026	8,99	5,327	7,83
11,515	15,27	8,286	13,77
16,749	27,82	11,245	20,66
18,494	31,94	12,725	24,51
20,239	36,80	14,204	28,70
21,983	41,51	15,684	32,76
23,728	46,56	17,164	37,24
25,473	51,55	18,643	41,80
27,217	56,30	20,123	46,23
28,962	60,67	21,602	50,54
30,707	65,12	23,082	54,99
32,451	69,02	24,562	59,39
35,941	75,34	26,041	63,52
39,430	80,69	27,521	66,99
42,920	84,88	29,000	70,80
46,409	87,99	31,960	76,40
49,898	90,51	34,919	82,49
		36,398	84,62
		37,878	86,62
		40,837	89,71
		43,797	92,19

$\text{P}_{50} = 24,93 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 21,41 \text{ mmHg}$

3.3 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,004$

3.4 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,092$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
3,626	3,19	4,696	4,53
5,893	6,31	7,458	8,52
8,159	10,17	10,221	14,33
10,426	14,92	11,602	17,55
12,692	20,70	12,983	21,00
14,959	26,97	14,364	24,55
17,225	34,12	15,746	28,28
19,492	41,90	17,127	32,13
21,758	49,20	18,508	36,21
24,025	56,42	19,889	40,67
26,291	63,20	21,270	45,31
28,558	69,59	22,652	49,82
30,824	74,91	24,033	54,57
33,091	79,17	25,414	59,28
35,357	82,61	26,795	63,75
37,624	85,96	28,176	67,91
44,423	92,29	29,558	71,97
		30,939	75,84
		33,701	81,89
		36,464	86,53
		39,226	89,84
		40,607	91,13

$\text{P}_{50} = 22,01 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 22,74 \text{ mmHg}$

3.5 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,131$

3.6 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,176$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
3,910	3,54	3,176	3,91
6,516	7,64	4,689	6,24
9,122	12,66	7,713	11,95
11,729	18,82	9,226	15,38
13,032	22,25	12,251	23,34
14,335	25,62	13,763	28,16
16,942	33,46	15,275	33,11
18,245	37,71	16,788	38,45
19,548	42,19	18,300	44,10
20,851	46,62	19,813	49,45
22,154	51,23	21,325	54,76
23,458	55,44	22,838	59,88
24,761	59,84	24,350	64,52
26,064	64,18	25,862	68,96
27,367	67,99	27,375	72,79
28,670	71,41	28,887	76,59
29,974	75,00	31,912	82,42
32,580	80,31	36,449	88,67
35,186	84,27	39,474	91,62
40,399	90,13		

$\text{P}_{50} = 21,81 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 19,97 \text{ mmHg}$

Tabelle II: Sauerstoffbindungskurven des frei gelösten Hämoglobins. Tabelle II enthält die ursprünglich gemessenen Sauerstoffbindungskurven des frei gelösten Hämoglobins. Die Temperatur beträgt immer 37°C.

1.1 $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,029$ 1.2 $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,115$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
3,856	4,97	2,085	3,24
5,783	9,32	3,574	7,04
7,711	14,54	5,062	11,86
8,675	17,73	6,551	17,60
9,639	21,11	7,296	20,46
10,603	24,94	8,040	24,12
11,567	29,04	8,785	27,91
12,531	33,41	9,529	31,88
13,494	37,93	10,274	36,09
14,458	42,66	11,018	40,10
15,422	47,23	11,763	44,78
16,386	51,94	12,507	49,00
17,350	56,55	13,252	53,30
18,314	60,73	13,996	57,51
19,278	64,85	14,741	61,75
20,242	68,46	15,485	65,56
21,206	71,81	16,230	69,22
22,170	75,38	16,974	72,61
23,133	78,01	17,719	75,56
25,061	83,03	18,463	78,24
26,989	86,98	19,952	83,28
28,917	89,92	21,441	87,03
30,845	92,46	22,930	90,09

$\text{P}_{50} = 15,99 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 12,68 \text{ mmHg}$

1.3 $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,286$

1.4 $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,509$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
2,177	3,49	1,623	3,55
3,166	6,01	2,705	7,19
4,155	9,02	3,788	11,51
5,145	12,37	4,870	16,24
6,134	16,43	5,952	22,21
7,124	20,79	7,034	29,23
8,113	25,99	8,116	36,52
9,102	31,72	9,198	44,35
10,092	37,77	10,281	52,27
11,081	44,14	11,363	59,85
12,071	50,19	12,445	66,73
13,060	56,50	13,527	72,81
14,049	62,12	14,609	77,80
15,039	67,71	15,691	82,10
16,028	72,51	16,774	85,42
17,018	76,82	17,856	88,24
18,007	80,62	18,938	90,42
18,996	83,77		
19,986	86,17		
20,975	88,43		
22,954	91,75		

$\text{P}_{50} = 12,04 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 9,97 \text{ mmHg}$

2.1 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 6,947$

2.2 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,052$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
3,487	2,86	2,851	2,66
5,538	5,62	5,044	5,89
7,589	9,06	7,236	9,95
9,641	13,02	9,429	14,81
11,692	17,73	11,622	20,78
13,743	23,48	12,719	24,13
15,794	29,72	13,815	27,88
17,845	36,58	14,912	31,75
19,896	43,84	16,008	35,68
21,948	51,09	17,104	39,93
23,999	58,16	18,201	43,94
26,050	64,73	19,297	48,23
28,101	70,75	20,394	52,42
30,152	75,83	21,490	56,74
32,204	80,33	22,587	60,56
34,255	84,00	23,683	64,50
36,306	87,06	24,779	68,04
38,357	89,64	25,876	71,33
40,408	91,55	26,972	74,21
		29,165	79,57
		31,358	83,64
		33,551	86,98
		35,744	89,64
		37,937	91,56

$\text{P}_{50} = 21,64 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 19,76 \text{ mmHg}$

2.3 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,213$

PO_2 [mmHg]	S [%]
3,125	2,46
5,356	6,50
7,588	11,48
9,820	18,01
10,936	21,73
12,052	25,47
13,168	30,14
14,283	34,91
15,399	40,01
16,515	45,02
17,631	50,05
18,747	54,80
19,863	59,52
20,979	63,81
22,095	67,67
23,211	71,17
25,442	77,38
27,674	82,27
29,906	86,21
32,138	89,20
34,370	91,35

$\text{P}_{50} = 17,62 \text{ mmHg}$

2.4 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,312$

$\text{PO}_2 \text{ [mmHg]}$	$\text{S [\%]}$	$\log \text{ PO}_2$	$\log (\text{S} / (1-\text{S}))$
3,441	4,49	0,5367	-1,327
4,551	6,57	0,6581	-1,153
5,661	9,17	0,7529	-0,996
6,771	12,32	0,8307	-0,852
7,882	15,91	0,8966	-0,723
8,992	19,69	0,9539	-0,611
10,102	24,47	1,0044	-0,489
11,212	29,49	1,0497	-0,379
12,322	34,79	1,0907	-0,273
13,432	39,92	1,1281	-0,178
14,542	45,83	1,1626	-0,073
15,652	51,10	1,1946	0,019
16,762	56,35	1,2243	0,111
17,872	61,33	1,2522	0,200
18,982	66,14	1,2783	0,291
20,092	70,29	1,3030	0,374
21,202	74,31	1,3264	0,461
22,312	77,79	1,3485	0,544
23,432	80,60	1,3698	0,619
24,533	83,22	1,3898	0,695
25,643	85,55	1,4090	0,772
26,753	87,53	1,4274	0,846
27,863	89,27	1,4450	0,920
28,973	90,81	1,4620	0,995

$\text{P}_{50} = 15,42 \text{ mmHg}$

3.1 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,088$

3.2 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,123$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
4,395	3,92	3,864	3,89
6,226	6,57	5,796	7,06
8,057	9,50	7,728	10,51
9,888	13,35	9,660	14,92
11,719	17,62	11,591	19,95
13,550	22,92	13,523	25,76
15,381	28,66	15,455	31,95
17,213	34,91	17,387	38,94
19,044	41,29	19,319	46,13
20,875	47,80	21,251	53,25
22,706	54,57	23,183	59,85
24,537	60,99	25,115	66,30
26,368	66,62	27,047	71,85
28,199	71,58	28,979	76,93
30,031	75,86	30,910	80,87
31,862	79,73	32,842	84,61
33,693	82,83	34,774	87,33
35,524	85,28	36,706	89,92
39,186	89,28	38,638	92,06
42,848	92,05		

$\text{P}_{50} = 21,47 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 20,37 \text{ mmHg}$

3.3 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,139$

3.4 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,210$

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
2,481	2,60	5,406	7,35
4,199	5,46	7,270	10,85
6,107	8,49	9,133	15,01
8,015	12,21	10,997	19,99
9,924	16,51	12,861	25,71
11,832	21,42	14,725	31,91
13,741	27,48	16,589	38,59
15,649	33,36	18,453	45,16
17,557	39,81	20,317	52,06
19,466	46,75	22,181	58,45
21,374	53,53	24,045	64,55
23,283	59,92	25,909	70,00
25,191	65,91	27,773	74,58
27,100	71,43	29,637	78,83
29,008	76,21	31,501	82,35
30,916	79,99	33,365	85,36
32,825	83,67	35,229	87,80
34,733	86,23	37,093	89,90
36,642	88,68	38,957	91,77
38,550	90,80		

$\text{P}_{50} = 20,38 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 19,76 \text{ mmHg}$

3.5 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,303$

$\text{PO}_2 \text{ [mmHg]}$	$\text{S [\%]}$
2,003	2,40
4,006	5,04
6,008	8,00
8,011	11,81
10,014	16,49
12,017	21,81
14,020	27,89
16,023	34,97
18,025	43,08
20,028	50,89
22,031	58,48
24,034	65,35
26,037	71,46
28,040	76,73
30,042	81,46
32,045	85,38
34,048	88,66
36,051	91,19

$\text{P}_{50} = 19,80 \text{ mmHg}$

Tabelle III: Sauerstoffbindungskurven mit 2,3-Diphosphoglycerat. Tabelle III enthält die Sauerstoffbindungskurven, die unter Zusatz von 2,3-Diphosphoglycerat an membrangebundenem und frei gelöstem Hämoglobin gemessen wurden. Die Temperatur beträgt immer 37°C.

1. membrangebundenes Hämoglobin; $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$

1.1 DPG=0,43mmol/l;pH=7,237 1.2 DPG=0,43mmol/l;pH=7,250

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
3,355	5,48	2,620	3,09
4,698	7,56	4,161	5,66
6,040	10,16	5,702	8,82
7,382	12,91	7,243	12,28
8,724	16,28	8,784	16,46
10,066	20,08	10,325	21,14
11,409	24,18	11,866	26,54
12,751	29,02	13,407	32,13
14,093	34,06	14,948	38,14
15,435	39,52	16,489	44,35
16,777	45,04	18,030	50,94
18,120	51,02	19,571	57,19
19,462	56,53	21,112	63,13
20,804	61,82	22,654	68,39
22,146	66,95	24,195	73,35
23,488	71,81	25,736	77,30
24,830	76,28	27,277	81,16
26,173	80,06	28,818	84,14
27,515	83,30	30,359	86,66
28,857	86,21	31,900	88,76
30,199	88,64	34,982	92,26
31,541	90,79		

$\text{P}_{50} = 17,89 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 17,81 \text{ mmHg}$

1.3 DPG= 5 mmol/l; pH=7,344

1.4 DPG= 5 mmol/l; pH=7,338

PO ₂ [mmHg]	S [%]	PO ₂ [mmHg]	S [%]
3,837	2,67	7,146	6,95
5,581	4,37	8,889	9,58
7,326	6,78	10,631	12,93
9,070	9,58	12,374	16,33
10,814	13,00	14,117	20,51
12,558	16,82	15,860	25,02
14,303	21,47	17,603	29,94
16,047	26,59	19,346	35,35
17,791	32,28	21,089	40,78
19,535	38,11	22,832	45,90
21,279	44,18	24,574	51,40
23,024	50,15	26,317	56,45
24,768	56,43	28,060	61,71
26,512	62,16	29,803	66,09
28,256	67,04	31,546	70,26
30,000	71,48	33,289	74,33
31,745	75,69	35,032	77,29
33,489	79,40	36,775	80,03
35,233	82,82	40,260	85,26
36,977	85,31	43,746	88,71
38,722	87,52	47,232	91,36
42,210	91,66		

P₅₀ = 22,98 mmHg

P₅₀ = 24,13 mmHg

2. frei gelöstes Hämoglobin; $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$

2.1 DPG=0,43mmol/l;pH=7,284

2.2 DPG=0,43mmol/l;pH=7,296

PO_2 [mmHg]	S [%]	PO_2 [mmHg]	S [%]
3,160	3,15	3,238	3,15
4,739	5,41	4,856	5,41
6,319	8,32	6,475	8,32
7,899	12,25	8,094	12,25
9,479	16,70	9,713	16,70
11,059	22,19	11,331	22,19
12,638	28,42	12,950	28,42
14,218	35,21	14,569	35,21
15,798	42,37	16,188	42,37
17,378	49,77	17,807	49,77
18,958	56,76	19,425	56,76
20,537	63,27	21,044	63,27
22,117	69,08	22,663	69,08
23,697	74,25	24,282	74,25
25,277	78,30	25,900	78,30
26,857	81,95	27,519	81,95
28,437	84,94	29,138	84,94
31,596	89,50	32,376	89,50
34,756	92,65	35,613	92,65

$\text{P}_{50} = 17,43 \text{ mmHg}$

$\text{P}_{50} = 17,86 \text{ mmHg}$

2.3 DPG= 5 mmol/l;pH=7,334

2.4 DPG= 5 mmol/l;pH=7,334

PO ₂ [mmHg]	S [%]	PO ₂ [mmHg]	S [%]
4,827	3,49	4,986	3,49
6,683	5,42	6,903	5,42
8,539	7,97	8,821	7,97
10,396	11,15	10,738	11,15
12,252	14,82	12,656	14,82
14,109	19,11	14,574	19,11
15,965	23,68	16,491	23,68
17,822	29,10	18,409	29,10
19,678	34,74	20,326	34,74
21,534	40,94	22,244	40,94
23,391	47,08	24,161	47,08
25,247	53,17	26,079	53,17
27,104	59,12	27,997	59,12
28,960	64,31	29,914	64,31
30,816	69,29	31,832	69,29
32,673	73,35	33,749	73,35
34,529	76,99	35,667	76,99
36,386	80,34	37,585	80,34
38,242	83,13	39,502	83,13
40,098	85,42	41,420	85,42
43,811	89,57	45,255	89,57
47,524	92,57	49,090	92,57

P₅₀ = 24,28 mmHg

P₅₀ = 25,08 mmHg

Tabelle IV: Korrigierte Sauerstoffbindungskurven

Die Werte von Tabelle IV sind aus den Bohr-Geraden der Tabelle VI für pH = 7,20 berechnet.

1. $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; pH = 7,20; Temp. = 37°C

S	membrangebundenes Hb	frei gelöstes Hb
	$\text{PO}_2 \text{ [mmHg]}$	$\text{PO}_2 \text{ [mmHg]}$
0,05	4,90	4,21
0,10	7,41	6,66
0,15	9,39	8,54
0,20	11,19	10,16
0,25	12,71	11,55
0,30	14,09	12,79
0,35	15,40	13,97
0,40	16,65	15,13
0,45	17,87	16,23
0,50	19,08	17,35
0,55	20,29	18,53
0,60	21,53	19,73
0,65	22,88	21,02
0,70	24,25	22,47
0,75	25,81	24,11
0,80	27,61	26,06
0,85	30,01	28,55
0,90	33,96	32,01

2. $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,20$; $\text{Temp.} = 37^\circ\text{C}$

S	membrangebundenes Hb	frei gelöstes Hb
	PO_2 [mmHg]	PO_2 [mmHg]
0,05	4,25	4,21
0,10	7,07	7,17
0,15	9,35	9,48
0,20	11,30	11,43
0,25	13,12	13,11
0,30	14,73	14,67
0,35	16,26	16,13
0,40	17,66	17,48
0,45	19,03	18,83
0,50	20,44	20,17
0,55	21,85	21,54
0,60	23,25	22,98
0,65	24,79	24,50
0,70	26,45	26,19
0,75	27,94	28,11
0,80	30,42	30,34
0,85	33,32	33,08
0,90	37,10	36,89

3. $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$; $\text{pH} = 7,20$; $\text{Temp.} = 37^\circ\text{C}$

S	membrangebundenes Hb	frei gelöstes Hb
	$\text{PO}_2 \text{ [mmHg]}$	$\text{PO}_2 \text{ [mmHg]}$
0,05	2,83	2,91
0,10	4,32	4,66
0,15	5,66	6,12
0,20	6,77	7,36
0,25	7,75	8,41
0,30	8,69	9,08
0,35	9,53	10,28
0,40	10,37	11,16
0,45	11,15	12,00
0,50	11,96	12,87
0,55	12,77	13,73
0,60	13,62	14,64
0,65	14,55	15,60
0,70	15,58	16,66
0,75	16,74	17,84
0,80	18,06	19,27
0,85	19,77	21,02
0,90	22,37	23,47

Tabelle V: Halbsättigungsdrucke P_{50}

Die Werte von Tabelle V sind aus den Urkurven
(Tabelle I bis III) berechnet.

1. membrangebundenes Hämoglobin; Temp. = 37°C

1.1 $PCO_2 = 7 \text{ mmHg}$

pH	P_{50} [mmHg]	log P_{50}	Bohr-Faktor
6,965	14,90	1,173	
6,979	14,17	1,151	
7,235	11,62	1,065	0,371
7,388	10,17	1,007	
7,460	9,59	0,982	

1.2 $PCO_2 = 40 \text{ mmHg}$

pH	P_{50} [mmHg]	log P_{50}	Bohr-Faktor
7,077	20,92	1,321	
7,250	18,60	1,270	
7,288	17,90	1,253	0,343
7,298	17,82	1,251	
7,312	17,07	1,232	

1.3 $PCO_2 = 70 \text{ mmHg}$

pH	P_{50} [mmHg]	log P_{50}	Bohr-Faktor
6,818	24,93	1,397	
6,995	21,41	1,331	
7,004	22,01	1,343	0,206
7,092	22,74	1,357	
7,131	21,81	1,339	
7,176	19,97	1,300	

1.4 DPG = 0,43 mmol/l; PCO₂ = 40 mmHg

pH	P ₅₀ [mmHg]	log P ₅₀
7,237	17,89	1,253
7,250	17,81	1,251

1.5 DPG = 5 mmol/l; PCO₂ = 40 mmHg

pH	P ₅₀ [mmHg]	log P ₅₀
7,334	22,98	1,361
7,338	24,13	1,383

2. Hämoglobinlösung; Temp. = 37°C

2.1 PCO₂ = 7 mmHg

pH	P ₅₀ [mmHg]	log P ₅₀	Bohr-Faktor
7,029	15,99	1,204	0,375
7,115	12,68	1,103	
7,286	12,04	1,081	
7,509	9,97	0,999	

2.2 PCO₂ = 40 mmHg

pH	P ₅₀ [mmHg]	log P ₅₀	Bohr-Faktor
6,947	21,64	1,335	0,387
7,052	19,76	1,296	
7,213	17,62	1,246	
7,312	15,42	1,188	

2.3 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$

pH	$\text{P}_{50} [\text{ mmHg }]$	$\log \text{P}_{50}$	Bohr-Faktor
7,088	21,47	1,332	
7,123	20,37	1,309	
7,139	20,38	1,309	0,139
7,210	19,76	1,296	
7,303	19,80	1,297	

2.4 $\text{DPG} = 0,43 \text{ mmol/l}; \text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$

pH	$\text{P}_{50} [\text{ mmHg }]$	$\log \text{P}_{50}$
7,284	17,43	1,241
7,296	17,86	1,252

2.5 $\text{DPG} = 5 \text{ mmol/l}; \text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$

pH	$\text{P}_{50} [\text{ mmHg }]$	$\log \text{P}_{50}$
7,334	24,28	1,385
7,334	25,08	1,399

Tabelle VI: Bohr-Faktoren

Die Werte von Tabelle VI sind aus den Urkurven (Tabelle I bis II) berechnet. Die Temperatur beträgt immer 37°C.

$-\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \text{pH}}$ = Bohr-Faktor = Steigung der Regressionsgeraden

b = Achsenabschnitt der Regressionsgeraden mit der $\log \text{PO}_2$ -Achse

r = Korrelationskoeffizient der Regressionsgeraden

1. membrangebundenes Hämoglobin

1.1 $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$

S	$-\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \text{pH}}$	b	r
0,05	0,425	3,511	-0,80
0,10	0,469	4,009	-0,99
0,15	0,421	3,781	-0,99
0,20	0,403	3,736	-0,99
0,25	0,392	3,714	-0,99
0,30	0,387	3,724	-0,99
0,35	0,378	3,701	-0,99
0,40	0,377	3,727	-0,99
0,45	0,375	3,747	-0,99
0,50	0,371	3,751	-0,99
0,55	0,368	3,753	-0,99
0,60	0,367	3,776	-0,99
0,65	0,365	3,790	-0,99
0,70	0,361	3,791	-0,99
0,75	0,360	3,813	-0,99
0,80	0,365	3,886	-0,99
0,85	0,365	3,926	-0,99
0,90	0,368	4,001	-0,99

1.2 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$

s	$-\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \text{pH}}$	b	r
0,05	0,193	2,080	-0,50
0,10	0,234	2,553	-0,65
0,15	0,276	2,959	-0,76
0,20	0,302	3,225	-0,86
0,25	0,291	3,199	-0,89
0,30	0,293	3,255	-0,92
0,35	0,301	3,357	-0,95
0,40	0,308	3,439	-0,96
0,45	0,322	3,568	-0,98
0,50	0,343	3,748	-0,98
0,55	0,362	3,913	-0,99
0,60	0,375	4,030	-0,99
0,65	0,398	4,224	-0,99
0,70	0,412	4,349	-0,98
0,75	0,431	4,512	-0,98
0,80	0,429	4,527	-0,97
0,85	0,427	4,555	-0,95
0,90	0,487	5,037	-0,92

1.3 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$

s	$-\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \text{pH}}$	b	r
0,05	0,193	2,017	-0,39
0,10	0,179	2,139	-0,45
0,15	0,181	2,274	-0,55
0,20	0,179	2,345	-0,62
0,25	0,173	2,366	-0,65
0,30	0,177	2,444	-0,69
0,35	0,184	2,538	-0,72
0,40	0,193	2,634	-0,76
0,45	0,201	2,725	-0,79
0,50	0,206	2,791	-0,83
0,55	0,211	2,859	-0,86
0,60	0,221	2,957	-0,87
0,65	0,225	3,017	-0,92
0,70	0,235	3,112	-0,93
0,75	0,268	3,373	-0,98
0,80	0,265	3,392	-0,97
0,85	0,268	3,455	-0,96
0,90	0,296	3,700	-0,95

2. Hämoglobinlösung

2.1 $\text{PCO}_2 = 7 \text{ mmHg}$

s	$-\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \text{pH}}$	b	r
0,05	0,487	3,973	-0,92
0,10	0,442	3,849	-0,92
0,15	0,415	3,771	-0,92
0,20	0,407	3,794	-0,93
0,25	0,400	3,804	-0,93
0,30	0,351	3,486	-0,81
0,35	0,387	3,796	-0,94
0,40	0,383	3,806	-0,94
0,45	0,378	3,799	-0,94
0,50	0,375	3,813	-0,94
0,55	0,372	3,819	-0,94
0,60	0,371	3,836	-0,94
0,65	0,367	3,839	-0,94
0,70	0,367	3,867	-0,94
0,75	0,362	3,857	-0,94
0,80	0,362	3,891	-0,94
0,85	0,354	3,872	-0,93
0,90	0,342	3,829	-0,92

2.2 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$

S	$-\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \text{pH}}$	b	r
0,05	0,302	2,802	-0,88
0,10	0,324	3,157	-0,96
0,15	0,356	3,494	-0,98
0,20	0,357	3,578	-0,98
0,25	0,368	3,710	-0,98
0,30	0,378	3,825	-0,98
0,35	0,382	3,898	-0,99
0,40	0,381	3,920	-0,99
0,45	0,388	4,005	-0,99
0,50	0,387	4,029	-0,99
0,55	0,385	4,041	-0,99
0,60	0,384	4,060	-0,99
0,65	0,381	4,068	-0,99
0,70	0,376	4,058	-0,99
0,75	0,375	4,081	-0,99
0,80	0,365	4,047	-0,99
0,85	0,361	4,053	-0,98
0,90	0,350	4,022	-0,98

2.3 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$

s	$-\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \text{pH}}$	b	r
0,05	0,397	3,486	-0,69
0,10	0,249	2,649	-0,61
0,15	0,187	2,323	-0,62
0,20	0,159	2,204	-0,62
0,25	0,132	2,068	-0,59
0,30	0,124	2,056	-0,60
0,35	0,123	2,090	-0,65
0,40	0,135	2,214	-0,74
0,45	0,138	2,268	-0,79
0,50	0,139	2,304	-0,81
0,55	0,136	2,310	-0,85
0,60	0,134	2,328	-0,88
0,65	0,135	2,358	-0,89
0,70	0,134	2,384	-0,89
0,75	0,133	2,403	-0,88
0,80	0,142	2,505	-0,90
0,85	0,167	2,721	-0,87
0,90	0,208	3,067	-0,84

Tabelle VII: CO₂-Faktoren

Die Werte aus Tabelle VII sind mittels Tabelle VI für pH = 7,20 berechnet. Die Temperatur beträgt 37°C. $\Delta \log \text{PCO}_2$ beträgt ($\log 40 - \log 7$) bzw. ($\log 70 - \log 40$), das entspricht einem mittleren $\log \text{PCO}_2$ von 23,5 mmHg bzw. 55 mmHg.

1. membrangebundenes Hämoglobin; pH = 7,20

1.1 mittlerer $\text{PCO}_2 = 23,5$ mmHg 1.2 mittlerer $\text{PCO}_2 = 55$ mmHg

S	$\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \log \text{PCO}_2}$	S	$\frac{\Delta \log \text{PO}_2}{\Delta \log \text{PCO}_2}$
0,05	0,315	0,05	-0,255
0,10	0,309	0,10	-0,084
0,15	0,291	0,15	-0,007
0,20	0,288	0,20	0,017
0,25	0,284	0,25	0,058
0,30	0,277	0,30	0,080
0,35	0,275	0,35	0,098
0,40	0,272	0,40	0,106
0,45	0,271	0,45	0,112
0,50	0,268	0,50	0,123
0,55	0,266	0,55	0,132
0,60	0,263	0,60	0,138
0,65	0,260	0,65	0,144
0,70	0,254	0,70	0,154
0,75	0,248	0,75	0,142
0,80	0,243	0,80	0,173
0,85	0,240	0,85	0,187
0,90	0,240	0,90	0,158

2. Hämoglobinlösung; pH = 7,20

2.1 mittlerer PCO₂ = 23,5 mmHg

2.2 mittlerer PCO₂ = 55 mmHg

S	$\frac{\Delta \log PO_2}{\Delta \log PCO_2}$	S	$\frac{\Delta \log PO_2}{\Delta \log PCO_2}$
0,05	0,212	0,05	-0,036
0,10	0,205	0,10	0,131
0,15	0,192	0,15	0,187
0,20	0,185	0,20	0,209
0,25	0,182	0,25	0,226
0,30	0,196	0,30	0,244
0,35	0,176	0,35	0,256
0,40	0,174	0,40	0,259
0,45	0,173	0,45	0,266
0,50	0,172	0,50	0,268
0,55	0,172	0,55	0,270
0,60	0,171	0,60	0,272
0,65	0,171	0,65	0,274
0,70	0,171	0,70	0,274
0,75	0,173	0,75	0,274
0,80	0,173	0,80	0,272
0,85	0,176	0,85	0,263
0,90	0,178	0,90	0,253

Tabelle VIII: Sauerstoffabhängige Protonendissoziation

Die Werte von Tabelle VIII sind aus den
Urkurven (Tabelle I und II) berechnet.

$\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$; Temp. = 37°C .

1. membrangebundenes Hämoglobin 2. Hämoglobininlösung

$\log \text{PO}_2$	$-\left(\frac{\Delta \text{SO}_2}{\Delta \log \text{H}^+}\right)$	$\log \text{PO}_2$	$-\left(\frac{\Delta \text{SO}_2}{\Delta \log \text{H}^+}\right)$
0,778	0,059	0,602	0,042
0,903	0,119	0,778	0,088
1,000	0,179	0,903	0,158
1,079	0,271	1,000	0,256
1,146	0,347	1,079	0,369
1,204	0,440	1,146	0,445
1,255	0,550	1,204	0,583
1,301	0,658	1,255	0,652
1,342	0,743	1,301	0,682
1,380	0,753	1,342	0,674
1,415	0,732	1,380	0,625
1,447	0,652	1,415	0,565
1,477	0,495	1,447	0,498
		1,477	0,402
		1,505	0,338
		1,531	0,275

Tabelle IX: Sauerstoffabhängige CO₂-Dissoziation

Die Werte von Tabelle IX sind mittels der Werte von Tabelle VI berechnet. pH = 7,20; Temp. = 37°C;
 $\Delta \log \text{PCO}_2 = \log 40 - \log 7$.

1. membrangebundenes
Hämoglobin

2. Hämoglobinlösung

log PO ₂	$-\left(\frac{\Delta \text{SO}_2}{\Delta \log \text{PCO}_2}\right)$	log PO ₂	$-\left(\frac{\Delta \text{SO}_2}{\Delta \log \text{PCO}_2}\right)$
0,778	0,121	0,778	0,076
0,903	0,195	0,903	0,125
1,000	0,278	1,000	0,190
1,079	0,363	1,079	0,239
1,146	0,428	1,146	0,283
1,204	0,454	1,204	0,303
1,255	0,452	1,255	0,301
1,301	0,418	1,301	0,279
1,342	0,364	1,342	0,246

Tabelle X: $n(S)$ - und $\Delta n(S)$ -Funktionen

Die Werte von Tabelle X sind mit Hilfe
der Werte von Tabelle VI berechnet.

Temp. = 37°C.

1. membrangebundenes Hämoglobin

1.1 $PCO_2 = 7$ mmHg

S	n	n
	(pH = 7,0)	(pH = 7,4)
0,075	1,68	1,85
0,125	1,87	1,58
0,175	2,04	1,86
0,225	2,22	2,05
0,275	2,25	2,15
0,325	2,59	2,37
0,375	2,53	2,50
0,425	2,86	2,80
0,475	2,92	2,78
0,525	3,15	2,98
0,575	3,19	3,17
0,625	3,29	3,20
0,675	3,42	3,24
0,725	3,54	3,49
0,775	3,64	3,89
0,825	3,87	3,88
0,875	3,69	3,77

1.2 $\text{PCO}_2 = 40 \text{ mmHg}$

S	n	
	(pH = 7,0)	(pH = 7,4)
0,075	1,73	1,89
0,125	1,81	2,13
0,175	1,85	2,13
0,225	2,36	2,17
0,275	2,43	2,46
0,325	2,45	2,69
0,375	2,64	2,85
0,425	2,65	3,18
0,475	2,66	3,57
0,525	2,87	3,84
0,575	3,14	3,82
0,625	2,98	4,25
0,675	3,53	4,41
0,725	3,54	4,70
0,775	4,34	4,21
0,825	4,19	4,13
0,875	3,06	4,82

1.3 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$

S	n (pH = 7,0)	n (pH = 7,4)
0,075	1,49	1,45
0,125	1,65	1,66
0,175	1,85	1,83
0,225	1,96	1,89
0,275	2,14	2,20
0,325	2,24	2,40
0,375	2,47	2,71
0,425	2,61	2,88
0,475	2,72	2,90
0,525	2,91	3,13
0,575	3,06	3,54
0,625	3,23	3,45
0,675	3,34	3,81
0,725	3,56	6,20
0,775	3,44	3,35
0,825	3,76	3,89
0,875	3,84	4,88

2.3 $\text{PCO}_2 = 70 \text{ mmHg}$

S	n	n
	(pH = 7,0)	(pH = 7,4)
0,075	1,61	1,24
0,125	1,84	1,50
0,175	2,01	1,75
0,225	2,31	1,92
0,275	2,32	2,16
0,325	2,42	2,40
0,375	2,47	2,84
0,425	2,71	2,81
0,475	2,91	2,93
0,525	3,10	2,97
0,575	3,21	3,14
0,625	3,32	3,34
0,675	3,44	3,43
0,725	3,59	3,51
0,775	3,56	3,99
0,825	3,56	4,64
0,875	3,61	5,15

VI. Literaturverzeichnis

Anderson, N.M. and Sekelj, P.

Light absorbing and scattering properties of non-hemolysed blood.

Physics Med. Biol. 12, 173-184 (1967)

Antonini, E. and Brunori, M.

Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands.

North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, 1971

Barnikol, W.K.R., Wahler, W., Döhring, W.

Spontaneous shift of the human O₂-Hb-equilibrium-curve (measured spectrometrically) up to 5 hours after venipuncture.

Pflügers Arch. (Suppl.) 347, R 44 (1974)

Barnikol, W.K.R., Burkhard, O.

Die Abhängigkeit des Hill'schen Parameters n von der O₂-Sättigung des Hämoglobins. Die Feinstruktur der O₂-Hb-Bindungskurve. Der direkte Nachweis für mindestens 3 Zustände des Hb-Moleküls mit unterschiedlicher O₂-Affinität.

Pflügers Arch. (Suppl.) 373, R 45 (1978)

Barnikol, W.K.R., Döhring, W., Wahler, W.

Eine verbesserte Modifikation der Mikromethode nach NIESEL und THEWS zur Messung von O₂-Hb-Bindungskurven in Vollblut und konzentrierten Hb-Lösungen.

Respiration 36, 86-95 (1978)

Barnikol, W.K.R.

Die $n(S)$ -Funktion und die $\Delta n(S)$ -Funktion als Hilfsmittel zum Studium homologer Wechselwirkungen von Liganden am Hb-Molekül.

12. Atmungsphysiologische Arbeitstagung in Göttingen, 1979

Benesch, R. and Benesch, R.E.

The effect of organic phosphates from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 26,162-167(1967)

Benesch, R., Benesch, R.E., Yu, C.I.

Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin.

Proc. Nat. Acad. Sci.(Wash) 59,526-532(1968)

Bessis, M., Bricka, M., Breton-Gorius, J., Tabuis, J.

New observations on sickle cells with special reference to their agglutinability.

Blood 9,39-45(1954)

Bohr, C., Hasselbalch, K., Krogh, A.

Über einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt.

Scand. Arch. Physiol. 16,402-412(1904)

Böning, D., Draude, W., Trost, F., Meier, U.

Interrelation between Bohr and temperature effects on the oxygen dissociation curve in men and women.

Respir. Physiol. 34,195-207(1978)

Chanutin, A., Curnish, R.R.

Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes.

Arch. Biochem. Biophys. 121,96-102(1967)

Collier, H.B. and Lam, A.

Binding of Ca^{2+} and Mg^{2+} by 2,3-diphosphoglycerate.

Biochim. Biophys. Acta 222,299-306(1970)

Dodge, J.R., Mitchell, C., Hanahan, D.J.

The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes.

Arch. Biochem. Biophys. 100,119-130(1963)

Evelyn, K.A., Malloy, H.T.

Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin, and sulfhemoglobin in a single sample of blood.

J. Biol. Chem. 126,655-662(1938)

Fischer, S., Nagel, R.L., Bookchin, R.M., Roth, E.F., Tellez-Nagel, I.

The binding of hemoglobin to membranes of normal and sickle erythrocytes.

Biochim. Biophys. Acta 375,422-433(1975)

Garby, L., Robert, M., Zaar, B.

Proton- and carbamino-linked oxygen affinity of normal human blood.

Acta physiol. scand. 84,482-492(1972)

Hlastala, M.P., Woodson, R.D.

Saturation dependency of the Bohr effect: interactions among H^+ , CO_2 , and DPG.

J. Appl. Physiol. 38,1126-1131(1975)

Hlastala, M.P., Woodson, R.D., Wranne, B.

Influence of temperature on hemoglobin-ligand interaction in whole blood.

J. Appl. Physiol. 43,545-550(1977)

Kilmartin, J.V. and Rossi-Bernardi, L.

Interaction of hemoglobin with hydrogen ions, carbon dioxide, and organic phosphates.

Physiol. Rev. 53,836-890(1973)

Kirschbaum, T.H.

Variability of magnitude of the Bohr effect in human fetal blood.

J. Appl. Physiol. 18,729-733(1963)

Kramer, K., Elam, J.D., Saxton, G.A., Elam, W.N., jr.
Influence of oxygen saturation, erythrocyte concentration, and optical depth upon the red and near infra-red light transmittance of whole blood.

Am. J. Physiol. 165,229-246 (1951)

Meier, U., Böning, D., Rubenstein, H.J.
Oxygenation dependent variations of the Bohr coefficient related to whole blood and erythrocyte pH.

Pflügers Arch. 349,203-213 (1974)

Niesel, W., Thews, G.

Ein neues Verfahren zur schnellen und genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des Blutes und konzentrierter Hämoproteidlösungen.

Pflügers Arch. 273,380-395 (1961)

Poyart, C., Bursaux, P., Guesnon, P., Teisseire, B.
Chloride binding and the Bohr effect of human fetal erythrocytes and HbF_{II} solutions.

Pflügers Arch. 376,169-175 (1978)

Richterich, R.

Klinische Chemie

Verlag S. Karger, Basel (Schweiz) , S.291 (1965)

Roughton, F.J.W. and Severinghaus, J.W.

Accurate determination of O₂ dissociation curve of human blood above 98.7% saturation with data on O₂ solubility in unmodified human blood from 0° to 37°C.

J. Appl. Physiol. 35,861-869 (1973)

Scholander, P.F.

Analyzer for accurate estimation of respiratory gases in one half cubic centimeter samples.

J. Biol. Chem. 167,235-250 (1947)

Severinghaus, J.W.

Blood gas calculator.

J. Appl. Physiol. 21,1108-1116 (1966)

Shaklai, N., Yguerabide, J., Ranney, H.M.

Interaction of hemoglobin with red blood cell membranes as shown by a fluorescent chromophore.

Biochemistry 16,5585-5592 (1977)

Shaklai, N., Yguerabide, J., Ranney, H.M.

Classification and localisation of hemoglobin binding sites on the red blood cell membrane.

Biochemistry 16,5593-5597 (1977)

Siggaard-Andersen, O.

Oxygen-linked hydrogen ion binding of human hemoglobin.

Effects of carbon dioxide and 2,3-diphosphoglycerate.

I. Studies on erythrolysate.

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 27,351-360 (1971)

Teisseire, B., Teisseire, L., Hérigault, R., Soulard, C.

A method of continuous recording on microsamples of the Hb-O₂ association curve. II. A study of Bohr effect and carbamino-formation.

Bull. Physiopath. resp. 11,853-862 (1975)

Tosteson, D.C., Carlsen, E., Dunham, E.T.

The effects of sickling on ion transport.

J. Gen. Physiol. 39,31-67 (1956)

Twersky, V.

Interface effects in multiple scattering by large, low-refracting absorbing particles.

J. opt. Soc. Am. 60,908-914 (1970)

Tyuma, I., Kamigawara, Y., Imai, K.

pH dependence of the shape of the hemoglobin-oxygen equilibrium curve.

Biochim. Biophys. Acta 310,317-320 (1973)

Tyuma, I., Ueda, Y.

Non-linear relationship between oxygen saturation and proton release, and equivalence of the Bohr and Haldane coefficients in human hemoglobin.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 1278-1283 (1975)

Wahler, W.

Die Genauigkeit des verbesserten Mikroverfahrens nach NIESEL und THEWS zur Messung von O₂-Hb-Bindungskurven. Ein Beispiel für die Anwendbarkeit des Verfahrens in der klinischen Diagnostik.

Medizinische Inauguraldissertation der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 1976

Wallach, D.F.H., Weidekamm, E.

The microarchitecture of erythrocyte membranes.

In: Erythrocytes, Thrombocytes, Leucocytes; herausgegeben von: Gerlach, E. et al., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1973

Weissbluth, M.

Hemoglobin. Cooperativity and electronic properties. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1974

Wyman, J.jr.

Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look.

Adv. Protein Chem. 19, 223-286 (1964)

Lebenslauf

Name	Karl Ludwig Hilt
Geburtstag	26. Dezember 1955
Geburtsort	Mainz
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Josef Hilt und Frieda Hilt, geb. Heintzen
Familienstand	ledig

Schulausbildung:

1962 - 1966	Besuch der Grundschule in Höhr-Grenzhausen
1966 - 1969	Besuch der Staatlichen Realschule in Höhr-Grenzhausen
1969 - 1974	Besuch des Naturwissenschaftlichen Gymnasiums in Worms
1974	Abitur

Studium:

1974 - 1981	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
Frühjahr 1981	Medizinisches Staatsexamen

Mainz im Mai 1981

Herrn Prof. Dr. Dr. G. Thews danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Physiologischen Institut der Universität Mainz durchzuführen.

Herrn Prof. Dr. Dr. W. Barnikol möchte ich besonders danken für die Themenstellung und für die Einführung in die Versuchstechniken. Ferner danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft während der Durchführung der Messungen sowie für die kritische Durchsicht der Dissertationsschrift.

